

Université de Montréal

Maturation néonatale des enzymes responsables du maintien du
glutathion intracellulaire chez le prématuré humain.

par

Jean-Claude Lavoie

Département de Pédiatrie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

novembre 1997

© Jean-Claude Lavoie, 1997



W
4
058
1998

Mention spéciale des études supérieures de
la Faculté de Médecine

Université de Montréal

par

Jean-Claude Lavoie

Département de Pathologie

Faculté de Médecine

Cette thèse a été présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître en Philosophie (M.Phil.)

en études biomédicales

Montréal, 1998



Jean-Claude Lavoie, M.D.

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Maturation néonatale des enzymes responsables du maintien du glutathion intracellulaire chez le prématuré humain.

présentée par

Jean-Claude Lavoie

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

- Docteur Émile Lévy, président rapporteur
- Docteur Philippe Chessex, directeur
- Docteur Christine Des Rosiers
- Docteur Marc Édouard Mirault, examinateur externe

Thèse acceptée le : 05.05.1988

A SOMMAIRE

L'incidence élevée de pathologies liées à des phénomènes d'oxydation suggère que le système de défense antioxydante de l'enfant né prématurément est faible. Le glutathion joue un rôle clé de la défense antioxydante, mais la maturation des enzymes nécessaires à son maintien est inconnue chez l'humain. L'hypothèse de travail est que le prématuré a un faible taux de glutathion dû à une immaturité des enzymes responsables de sa synthèse et/ou de sa régénération.

Des méthodes spectroscopiques et fluorométriques ont été utilisées pour la détermination des activités enzymatiques et des niveaux de glutathion. Les résultats, analysés par ANOVA ou ANCOVA, sont présentés dans trois articles.

Dans le premier article, la veine du cordon ombilical d'enfants nés à terme a été perfusée par une solution contenant des peroxydes à des concentrations avoisinant celles mesurées dans des solutions de nutrition parentérale destinées aux nouveau-nés. Ceci a induit une relâche de glutathion seulement chez le garçon, tandis qu'une hausse de PGE₂ et PGI₂ était observée seulement chez la fille. La synthèse de PGE₂ et PGI₂ est dépendante du statut oxydant dans la cellule. Ces résultats suggèrent que dans certains tissus provenant de la fillette, un niveau critique d'oxydants stimule l'activité de la glutathion réductase (GSSG-R). Cette hypothèse a été vérifiée au deuxième article.

Dans cet article, l'activité de la GSSG-R a été mesurée dans des

leucocytes isolés d'aspirats endotrachéaux d'enfants intubés. L'activité de la GSSG-R différait aussi selon le genre, et était positivement affectée par l'âge de gestation (de 26 à 41 semaines) et l'âge postnatal (jour 1, 2 et 6). Dans ces cellules, la concentration de glutathion, plus élevée chez la fillette, était positivement corrélée à l'âge de gestation, tandis que l'effet de l'âge postnatal n'était pas significatif. Les faibles taux de glutathion chez les prématurés suggèrent une immaturité de la synthèse du GSH. Cette hypothèse fut l'objet du troisième article.

Dans les leucocytes d'aspirats, la capacité de synthétiser le GSH n'était pas affectée par le genre ou par l'âge postnatal. Cependant, l'activité était plus élevée chez les enfants les plus prématurés, suggérant une déficience en substrat. En effet, un faible niveau de GSH favorise la production d'enzymes impliquées dans sa synthèse, et l'activité de l'enzyme responsable de la disponibilité intracellulaire de la cystéine, la γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), n'était positivement affectée que par l'âge postnatal.

L'ensemble de ces résultats démontre que le système glutathion (contenu en glutathion, synthèse, γ -GT et GSSG-R) chez l'humain est affecté par l'âge de gestation, l'âge postnatal et le genre. Le faible contenu cellulaire en glutathion chez le prématuré n'est pas expliquée par une immaturité de l'activité de la synthèse ni de la γ -GT. Un faible apport en substrat pourrait être en cause. Les connaissances nouvelles apportées par ce travail sont que, chez le prématurés, les enzymes responsables du maintien de la concentration intracellulaire de glutathion sont fonctionnelles.

B **TABLE DES MATIÈRES**

A	SOMMAIRE	page	iii
B	TABLE DES MATIÈRE	page	v
C	LISTE DES TABLEAUX	page	ix
D	LISTE DES FIGURES	page	xi
E	LISTE DES ABRÉVIATIONS	page	xiv
F	LISTE DES SIGLES	page	xvii
G	LISTE DES ANNEXES	page	xviii
H	REMERCIEMENTS	page	xix
	CHAPITRE 1. INTRODUCTION	page	1
	1.1 Oxydants	page	8
	1.2 Antioxydants	page	13
	1.3 Glutathion	page	16
	1.3.1 Méthode de dosage utilisée	page	25
	1.4 Synthèse du glutathion	page	29
	1.4.1 γ -Glutamylcystéine synthétase	page	29
	1.4.1.1 Structure	page	29
	1.4.1.2 Mécanisme catalytique	page	31
	1.4.1.3 Activité	page	33
	1.4.1.4 Réponse à l'agression oxydante	page	33

1.4.2	Glutathion synthétase	page 35
1.4.2.1	Structure	page 35
1.4.2.2	Mécanisme catalytique	page 35
1.4.2.3	Activité	page 36
1.4.2.4	Déficiences en glutathion synthétase	page 36
1.4.3	Méthode de dosage utilisée	page 38
1.5	γ -Glutamyltranspeptidase	page 52
1.5.1	Structure	page 52
1.5.2	Mécanisme catalytique	page 53
1.5.3	Activité	page 54
1.5.4	Régulation	page 54
1.5.5	Méthode de dosage utilisée	page 56
1.6	Glutathion réductase	page 57
1.6.1	Structure	page 57
1.6.2	Mécanisme catalytique	page 58
1.6.3	Activité	page 63
1.6.4	Régulation	page 65
1.6.5	Méthode de dosage utilisée	page 67
1.7	Capacité antioxydante du nouveau-né	page 68
1.7.1	Maturation de la défense antioxydante	page 70
1.7.1.1	Chez l'humain	page 70
1.7.1.2	Chez l'animal	page 73
1.8	Objectifs	page 76
1.9	Modèles expérimentaux	page 77
1.10	Eicosanoïdes	page 80

CHAPITRE 2. PUBLICATIONS	page 83
2.1 Gender-related response to a tert-butylhydroperoxide-induced oxidation in human neonatal tissue.	page 84
2.1.1 Abstract	page 85
2.1.2 Introduction	page 86
2.1.3 Materials and Methods	page 87
2.1.4 Results	page 90
2.1.5 Discussion	page 92
2.1.6 Tables and figures	page 96
2.1.7 List of abbreviations	page 101
2.1.8 References	page 102
2.2 Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues.	page 107
2.2.1 Abstract	page 108
2.2.2 Introduction	page 109
2.2.3 Materials and Methods	page 111
2.2.4 Results	page 117
2.2.5 Discussion	page 120
2.2.6 Tables and figures	page 126
2.2.7 List of abbreviations	page 133
2.2.8 References	page 134
2.3 Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants.	page 142
2.3.1 Abstract	page 144

2.3.2	Introduction	page 145
2.3.3	Materials and Methods	page 147
2.3.4	Results	page 152
2.3.5	Discussion	page 155
2.3.6	Table and figures	page 161
2.3.7	List of abbreviations	page 164
2.3.8	References	page 165
CHAPITRE 3. DISCUSSION		page 173
3.1	Premier article	page 174
3.2	Deuxième article	page 179
3.3	Troisième article	page 188
3.4.	Pertinence	page 194
3.5.	Conclusion	page 199
CHAPITRE 4. BIBLIOGRAPHIE		page 201

C LISTE DES TABLEAUX

i) du CHAPITRE 1, Section 1.7 :

Tableau 1 : Effet de différentes concentrations de buthionine sulfoximine (BSO) sur l'obtention d'une activité de synthèse de GSH par des leucocytes isolés de sang de cordon d'enfants nés à terme. page 50

ii) du CHAPITRE 2, Section 2.1 :

Table 1: Summary of statistical analysis for data of Figure 1 page 96

Table 2: Summary of statistical analysis for data of Figures 2 and 3 page 97

iii) du CHAPITRE 2, Section 2.2 :

Table 1 : Effect of Gender and Postnatal Age on the Activity of GSSG-R (mU/10⁶ Cells) in Cells from Tracheal Aspirates in Infants Requiring Low (FiO₂ < 0.3) vs High (FiO₂ ≥ 0.3) Oxygen Supplementation. page 126

Table 2 : Effect of Gender on the Intracellular Content of Glutathione and the GSSG-R Activity in Cells of Tracheal Aspirates from 22 to 27-day Old Infants. page 127

iv) du CHAPITRE 2, Section 2.3 :

Table 1 : Activity of glutathione synthesis in
leukocytes from cord blood.

page 161

D LISTE DES FIGURES

1) du CHAPITRE 1 :

Figure 1.	Cycle gamma-glutamyle	page 18
Figure 2.	Système GPx - GSSG-R	page 22
Figure 3	Dosage du glutathion	page 25
Figure 4	Synthèse du glutathion	page 38
Figure 5	Effet de la concentration de phosphate sur le Km de la glutathion réductase pour le GSSG.	page 62
Figure 6	Synthèse d'eicosanoïdes	page 81

ii) du CHAPITRE 2, Section 2.1 :

Figure 1 :	Comparisons between boys and girls of basal values of eicosanoids (PGE ₂ , 6-keto-PGF _{1α} , PGF _{2α} , TxB ₂) and total glutathione obtained in a non-stimulated state in the eluate of perfused veins.	page 98
------------	---	---------

- Figure 2 : Effects of TBH (0.25 and 1.0 mmol/L) on the relative concentrations (% of control) of eicosanoids (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TxB₂) and total glutathione in the eluate of perfused veins obtained from boys. page 99
- Figure 3 : Effects of TBH (0.25 and 1.0 mmol/L) on the relative concentrations (% of control) of eicosanoids (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TxB₂) and total glutathione in the eluate of perfused veins obtained from girls. page 100
- iii) du CHAPITRE 2, Section 2.2 :
- Figure 1 : Effect of TBH (10⁻⁴ and 10⁻³ M) on the relative activity of GSSG-R (% of control, mean ± SEM). page 128
- Figure 2 : Effect of TBH (10⁻⁴ and 10⁻³ M) on cellular viability (mean ± SEM). page 129
- Figure 3 : Effect of a 3h incubation with TBH (10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ and 10⁻³ M) on the relative activity of GSSG-R (% of the control with no TBH, mean ± SEM). page 130

Figure 4 : Effect of gestational and postnatal age on the activity of glutathione reductase (GSSG-R) (mean \pm SEM) measured in cells from tracheal aspirates of mechanically ventilated newborn infants. no TBH, mean \pm SEM). page 131

Figure 5 : Effect of gender and gestational age on the intracellular content of total glutathione (mean \pm SEM) measured in cells from tracheal aspirates of mechanically ventilated newborn infants. page 132

iv) du CHAPITRE 2, Section 2.3 :

Figure 1 : Glutathione synthesis in cells from tracheal aspirates (TAC) derived from ventilated and oxygen-dependent infants of different gestational ages. page 162

Figure 2 : γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) activity of leukocytes derived from cord blood, and from tracheal aspirates (TAC). page 163

E LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANCOVA	Analyse de covariance
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
BCNU	1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée
BSO	Buthionine sulfoximine
Cys	Cystéine
DEC	Détecteur électrochimique
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothréitol
EDTA	acide (éthylènedinitrilo)tétra-acétique
ELF	<i>Epithelial lining fluid</i>
FAD	Flavide adénine dinucléotide
FiO ₂	Fraction inspiratoire en oxygène
γ -GCase	γ -Glutamylcystéine synthétase
γ -G-pNA	γ -Glutamyl-para-anilide
γ -GT	γ -Glutamyltranspeptidase

Glu	Acide glutamique
Glucose-6-P	Glucose-6-phosphate
Glucys	Glutamylcystéine
Gly	Glycine
Glygly	Glycylglycine
GPx	Glutathion peroxydase
GS•	Radical glutathionyle
GSH	Glutathion
GSHase	Glutathion synthétase
GSSG	Disulfure de glutathion
GSSG-R	Glutathion réductase
GST	Glutathion S-transférase
Hb	Hémoglobine
HNE	4-hydroxy-2-nonéal
HPLC	Chromatographie liquide sous haute pression
6-keto-PGF _{1α}	6-Keto-prostaglandine F _{1α} , métabolite stable de PGI ₂
L	Acide gras
LOO•	Radical hydroperoxyde
LOOH	Hydroperoxyde
mBrB	Monobromobimane
mClB	Monochlorobimane
MDA	Malondialdéhyde
NAD	Nicotine adénine dinucléotide en son état oxydé
NADH	Nicotine adénine dinucléotide en son état réduit
NADP	Nicotine adénine dinucléotide phosphate en son état oxydé

NADPH	Nicotine adénine dinucléotide phosphate en son état réduit
NEM	N-éthylmaléimide
OPase	5-oxo-prolinase
OTC	Acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxylique
PG	Prostaglandine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
P _i	Phosphore inorganique
pNA	Para-nitroaniline
RL	Radical libre
ROH	alcool
ROOH	peroxyde
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SOD	Superoxyde dismutase
TAC	<i>Cells from tracheal aspirates</i>
TA cells	<i>Cells from tracheal aspirates</i>
TBH	Tert-butylhydroperoxyde
TLC	Chromatographie sur couche mince
TNB	Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
TRIS	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propandiol
TxA ₂	Thromboxane A ₂
TxB ₂	Thromboxane B ₂ , métabolite stable DE TxA ₂
U	Unité
2-VP	2-Vynylpyridine

F **LISTE DES SIGLES**

kD	Kilodalton, masse relative au douzième de celle du carbone
K _i	Constante d'inhibition
K _m	Constante de Michaelis-Menten
M	Molaire
μM	Micromolaire
μL	Microlitre
mM	Millimolaire
n	Représente l'effectif
r ²	Coefficient de corrélation de monsieur Person
[S]	Concentration du substrat
s.e.m.	Standard error of mean
v	Vitesse de réaction
V _{max}	Vitesse maximum d'activité d'une enzyme

G LISTE DES ANNEXES

À la dernière page de la couverture

Tirés-à -parts des articles

Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxyde-induced oxidation in human neonatal tissue.* Free Rad Biol Med 1994; 16:307-13.

Lavoie JC, Chessex P. *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues.* Free Rad Biol Med 1997; 23:648-57.

Copie de l'épreuve d'imprimerie de l'article

Lavoie JC, Chessex P. *Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants* Free Rad Biol Med 1998; sous presse.

H REMERCIEMENTS

Philippe Chessex

La direction du docteur Philippe Chessex a été essentielle à la réalisation de cette thèse. Je tiens à le remercier pour le temps et le sérieux qu'il m'a consacrés. Réaliser ce projet de doctorat à ses côtés a été formateur autant au niveau scientifique (production, pertinence) que de la diffusion des connaissances (articles, congrès). Merci.

Jocelyne Vallée

L'obtention des aspirats endotrachéaux et des renseignements complémentaires nécessaires, a été possible grâce au professionnalisme de madame Jocelyne Vallée. Merci Jocelyne pour ta précieuse collaboration.

Mon épouse Anne

Beaucoup de temps a été consacré aux travaux et à la rédaction de cette thèse. Merci Anne pour ces années de compréhension, d'encouragements et de supports.

Dieu

Je tiens aussi à remercier le Seigneur, par qui tout cela a été possible.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Chez les organismes aérobies, l'oxygène est un élément essentiel à la vie. Dans la mitochondrie, la réduction d'une molécule de O_2 en H_2O requiert un transfert de quatre électrons. Cette réduction est nécessaire pour produire l'ATP. Puisque le rendement de ce transfert n'est pas parfait, des métabolites de l'oxygène partiellement réduits sont libérés dans la cellule. Ces molécules oxydantes peuvent réagir avec des molécules environnantes, et en changer leurs propriétés biochimiques. D'autres processus enzymatiques produisent aussi des molécules oxydantes. Afin de contrer les effets toxiques des métabolites réactifs de l'oxygène, la cellule possède un système antioxydant sophistiqué. À cause de sa haute concentration cellulaire et de son interaction avec les autres composantes de la défense antioxydante, le glutathion est reconnu comme étant une molécule clé et centrale dans cette défense.

L'homéostasie entre oxydants et antioxydants est maintenue grâce à l'influence du premier sur le second. Une élévation du statut oxydant entraîne dans la cellule une induction transitoire du système antioxydant. Cependant, le dépassement de la capacité antioxydante est possible et peut avoir des répercussions importantes pour la cellule. À des niveaux sub-létaux, des éléments oxydants peuvent influencer le métabolisme normal de la cellule en agissant comme régulateur de la phosphorylation, de la transcription génique et de la concentration intracellulaire de calcium (1, 2, 3, 4). Cependant, une quantité plus importante

d'oxydants peut avoir des conséquences pathophysiologiques. En fait, selon l'intensité de ce déséquilibre en faveur d'un statut oxydant, la fonction cellulaire sera affectée différemment: depuis la modulation cellulaire (différentiation/multiplication), à l'induction de fibrose, à l'inflammation, jusqu'à la mort de la cellule (5). La liste des pathologies reliées à des phénomènes oxydants est longue (6, 7). Parmi les principales complications notons l'athérosclérose, certains cancers, le vieillissement, l'arthrite rhumatoïde, la fibrose et le syndrome d'ischémie-reperfusion.

Une charge oxydante accrue, et/ou une capacité antioxydante réduite, peuvent rompre l'équilibre en faveur de l'offense oxydante. Ces deux situations sont soupçonnées chez l'enfant né prématurément.

Lors de la naissance, le tissu pulmonaire entre pour la première fois en contact avec l'air ambiant, où la pression partielle d'oxygène, 150 mm Hg (8), est de plusieurs fois supérieure à celle qu'il a connue *in utero*, 20-25 mm Hg (8). Il est essentiel que son système antioxydant soit suffisamment mature pour retirer les bénéfices de l'oxygène (sa captation par l'hémoglobine) tout en contrant les effets toxiques de l'oxydation des molécules environnantes. Le nouveau-né à terme est préparé pour le stimulus oxydant que représente la naissance. Cependant, pour les enfants nés prématurément le portrait pourrait être tout autre. À cause de leur immaturité, ces enfants reçoivent souvent un supplément d'oxygène et une nutrition totalement parentérale.

L'oxygénothérapie constitue en soi une charge oxydante (9, 10), et comme nous l'avons récemment décrit dans *Pediatrics*, la nutrition parentérale peut contenir de hautes concentrations de molécules au pouvoir oxydant appelées peroxydes (11). D'autre part, certains indices épidémiologiques et biologiques suggèrent une immaturité de la capacité antioxydante chez les enfants nés prématurément. La concentration de glutathion dans l'érythrocyte (28) et le plasma (8) des enfants nés prématurément est basse. En fait, la maturation de la capacité antioxydante est peu connue chez l'humain (voir la section 1.7 «CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DU NOUVEAU-NÉ» à la page 68).

Le **but de la thèse** est de contribuer à l'enrichissement des connaissances sur la capacité antioxydante de l'enfant nouveau-né. Plus précisément, elle porte sur la maturation des enzymes responsables du maintien de la concentration intracellulaire de glutathion chez l'humain en période postnatale immédiate en relation avec l'âge de gestation à la naissance (voir la section 1.8 «OBJECTIFS» à la page 76).

Le laboratoire de nutrition néonatale du docteur Philippe Chessex, à l'hôpital Sainte-Justine, s'intéresse depuis plusieurs années à l'impact de molécules oxydantes sur des tissus néonataux humains. Mes travaux de recherche pour l'obtention du diplôme de Maîtrise, consistaient en la mise au point d'un modèle vasculaire pour étudier les effets biochimiques de molécules oxydantes. Ce modèle a permis de démontrer que les particules oxydantes, radicaux libres ou peroxydes, influençaient

différemment la synthèse de divers eicosanoïdes (12, 13). L'analyse statistique des données qui ont généré les publications rapportant ces travaux, démontrait une haute signification pour la variable «entre-sujets». Cette variation aurait pu être due bien naturellement au polymorphisme humain. Mais, suite à la revue de la littérature sur le glutathion, une idée a germé. Cette variation inter-sujets serait-elle expliquée par le sexe des enfants? Cette hypothèse était supportée par un article rapportant que chez le jeune rat, l'activité hépatique de la γ -glutamyltranspeptidase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase étaient plus basses chez le mâle que chez la femelle (14). Une analyse rétrospective des données de mes publications a confirmé un effet lié au genre. La vérification de cette hypothèse fait partie du premier article (page 85) formant le corps de cette thèse:

Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxyde-induced oxidation in human neonatal tissue.* Free Rad Biol Med 1994; 16:307-13.

Cet article porte sur l'effet d'un peroxyde sur la synthèse d'eicosanoïdes et la relâche de glutathion par les cellules endothéliales de la veine ombilicale. La production veineuse d'eicosanoïdes a déjà été traitée lors de mon mémoire de Maîtrise. Afin de faciliter la compréhension de l'article, j'introduirai succinctement la formation des eicosanoïdes dans une section juste avant l'article. Celui-ci a mis en lumière la différence de réponse à un stimulus oxydant entre un tissu néonatal provenant

de garçons et de filles. Puisque la formation de certaines eicosanoïdes est étroitement liée à la présence d'oxydants et de glutathion dans la cellule, les changements notés suggéraient que la différence pouvait être due à la plus grande capacité du tissu des fillettes d'augmenter l'activité de la glutathion réductase lorsque mis dans des conditions oxydantes. Cette **hypothèse** fut confirmée dans le second article (page 108):

Lavoie JC, Chessex P. *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues.* Free Rad Biol Med 1997; 23:648-57.

En fait, le but de l'article était double : vérifier l'hypothèse émise suite au premier article, et vérifier si cette différence entre les genres était liée à la maturité de l'enfant. Le premier but a été vérifié avec le modèle de la veine ombilicale, tandis que l'effet de la maturité l'a été avec des leucocytes provenant d'aspirats endotrachéaux d'enfants intubés. Avec ce modèle, l'effet de l'âge de gestation ainsi que celui de l'âge postnatal immédiat (jusqu'à six jours) ont été recherchés sur l'activité de la glutathion réductase ainsi que sur le contenu en glutathion. En effet, une conséquence possible de cette observation serait une concentration intracellulaire de glutathion différente selon le genre, lorsque la cellule est soumise à des conditions oxydantes. Les résultats observés ont soulevé la possibilité d'une immaturité de la synthèse du glutathion dans les leucocytes d'aspirats endotrachéaux d'enfants intubés. Le troisième article (page 143) a évalué cette **hypothèse**.

Lavoie JC, Chessex P. *Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants* Free Rad Biol Med 1998; sous presse,

Cet article apporte des réponses autant pour la synthèse du glutathion que pour une autre enzyme importante de son métabolisme, la γ -glutamyltranspeptidase.

L'ensemble des résultats de ces trois articles constitue un enrichissement des connaissances sur la maturation de la capacité antioxydante chez l'humain. Ces résultats documentent l'effet de la maturation chez l'enfant né entre 26 et 40 semaines, et la maturation postnatale immédiate, sur la concentration intracellulaire de glutathion, sur la capacité de synthétiser le GSH et sur les activités de la glutathion réductase et de la γ -glutamyltranspeptidase, dans des tissus néonataux provenant de garçons et de filles.

Afin de choisir les méthodes les plus appropriées pour la vérification des hypothèses, il est important de bien connaître les propriétés et les taux d'activités ou de concentrations des paramètres à doser. C'est pourquoi un résumé des connaissances sur le glutathion (page 16), sur sa synthèse (page 29), sur la γ -glutamyltranspeptidase (page 52) et sur la glutathion réductase (page 57) font l'objet de quatre sections distinctes. À la fin de celles-ci, le choix de la méthode de détermination est commenté (section «DOSAGE UTILISÉ»). Puisque ces méthodes sont décrites dans les trois articles, la section sur le «dosage utilisé» ne reprend

pas ces détails mais les complète.

À la suite des articles, une discussion générale de la thèse (page 174) constitue le troisième chapitre. Sans reprendre les discussions des trois articles, on y retrouve une synthèse des résultats avec des conclusions et des perspectives d'avenir.

Le dernier chapitre, «BIBLIOGRAPHIE» à la page 200, est un recueil des sources documentaires ayant servi aux chapitres un et trois. La bibliographie du chapitre deux est présentée séparément avec chaque article sous les rubriques «*REFERENCES*».

1.1 OXYDANTS

Un atome est défini comme étant un radical libre (RL) lorsque sa dernière couche électronique est occupée par un électron célibataire. Cette particularité lui confère une grande réactivité. Pour abaisser son niveau d'énergie, l'atome cherchera à doubler cet électron. C'est en comblant sa dernière orbite par une paire d'électrons qu'une molécule sera dite dans un état «réduit». Donc, c'est en arrachant un électron à une autre molécule que le radical libre «oxyde» cette molécule, ce qui en fait une molécule oxydante. Par conséquent, une molécule dite «antioxydante» aura la propriété de fournir l'électron manquant tout en ne devenant pas elle-même oxydante.

Laissés à eux-mêmes, les RL réagissent de façon non spécifique avec de nombreuses autres molécules. Les radicaux libres peuvent combler leur besoin en électron de trois façons (15). Premièrement, le radical libre peut donner son électron et devenir ionique; deuxièmement, il peut arracher un électron à une autre molécule, produisant ainsi une autre particule radicalaire; troisièmement, il peut se lier à la molécule cible, cette nouvelle molécule formée conservant le caractère radicalaire. Les dommages causés par la libération de RL sont multiples et varient selon l'endroit où ils sont produits. Les dommages vont de l'inactivation protéique ou la modification de l'ADN, à l'activation d'autres molécules.

Les doubles liaisons des acides gras des membranes lipidiques cellulaires sont des sources d'électrons pouvant doubler l'électron

unique de la couche externe des radicaux libres. Vu leur abondance en biologie, les acides gras sont une cible de choix pour l'attaque radicalaire. Ces réactions chimiques ont été largement étudiées. Les métabolites formés servent de marqueurs biochimiques. Leur détermination permet d'établir, de qualifier ou de quantifier, si un organisme a subi une offense oxydante surpassant le pouvoir antioxydant.

La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne avec trois étapes: initiation, propagation et terminaison (16, 17, 18). L'initiation se produit lorsqu'un RL se lie ou arrache un électron à l'acide gras (L). Cette molécule maintenant radicalaire ($L\bullet$) peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former le radical hydroperoxyde ($LOO\bullet$) qui par attraction d'un électron d'une autre molécule d'acide gras, devient hydroperoxyde ($LOOH$). Et la propagation se poursuit avec l'acide gras radicalaire ainsi formé. Cette réaction se termine soit par épuisement du substrat ou par l'action de molécules antioxydantes telles que l'alpha-tocophérol qui fournit l'électron manquant (19, 20, 21).

Selon l'acide gras cible et le site de l'attaque radicalaire, les intermédiaires formés seront différents. Puisque l'énergie de dissociation de la liaison C-H d'une structure bis-allylique est plus faible que celle d'une structure mono-allylique (environ 75 versus 88 kcal/mole) (17), les acides gras polyinsaturés perdront plus facilement leur électron (22) pour devenir le radical sur lequel l'oxygène se fixera pour former l'hydroperoxyde. Lors de cette addition, le réarrangement chimique produit un diène

conjugué pouvant être détecté par spectroscopie à 230-235 nm (23, 24). La liaison LO-OH de l'hydroperoxyde a une énergie de dissociation d'environ 44 kcal/mole (17). Donc, il ne suffit que d'un donneur d'électron tel qu'un atome métallique, Fe^{2+} ou Cu^+ , pour que ce dernier ne devienne le radical alkoxyloxy ($LO\bullet$) (15, 17). Celui-ci peut arracher un électron d'un autre acide gras et ainsi maintenir la propagation de la peroxydation lipidique. Cependant, par scission d'un lien C-C, il y aura formation d'un aldéhyde et possiblement d'un alcane (16, 18, 21). Ce dernier est produit par l'addition de O_2 sur la double liaison près de l'extrémité méthyle de l'acide gras; le pentane sera formé à partir des acides gras n-6, et l'éthane sera libéré des n-3 (19). Ces gaz sont mesurés dans l'air exhalé comme indice de peroxydation des lipides exogènes et/ou endogènes (25). Parmi les aldéhydes produits, l'hexanal (26, 27), le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (28, 29) et le malondialdéhyde (MDA) (28, 30) sont les plus couramment recherchés.

La quantification des hydroperoxydes, des alcanes, des aldéhydes ainsi que des diènes conjugués ou encore de molécules formées par l'action des RL sur des protéines ou l'ADN est utilisée comme indice d'une offense oxydante (15, 23). La présence ou l'absence de ces indices n'est pas nécessairement reliée à une injure oxydante présente ou passée. En effet, ces composés chimiques participent au métabolisme normal de l'organisme et leur origine n'est pas exclusivement liée à l'oxydation des lipides membranaires. Par exemple, des aldéhydes déshydrogénases peuvent cataboliser le MDA et l'hexanal (31, 32) tandis que le HNE

est, entre autres, éliminé par voie de conjugaison par la glutathion S-transférase (32, 33). Les sources de MDA sont multiples (31, 34), notons que lors de la formation du thromboxane A₂, une quantité équivalente de MDA est produite (28, 31). De même, les alcanes provenant de la fermentation dans le tube gastro-intestinal peuvent être un contaminant lors de la détermination des alcanes dans l'air expiré (22).

Soulignons qu'une détection positive d'indices de peroxydation lipidique suggère que la capacité antioxydante de la cellule fût dépassée. De plus, le dommage cellulaire peut exister avant même que la peroxydation des membranes ait lieu, ou encore, en parallèle à l'oxydation lipidique. Certains métabolites de la peroxydation lipidique sont toxiques. Les aldéhydes peuvent former des groupements carbonyles sur les différentes macromolécules (35), ou encore, réagir avec des résidus lysine des protéines (36). Ceci peut conduire, par exemple, à une inactivation de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (36) ou à une activation de la synthèse du collagène (37, 38) lors de fibrose (38). En plus d'avoir un haut potentiel oxydant, les peroxydes influencent la production de molécules vaso-actives telles que les prostaglandines et thromboxanes (39, 40). En effet, il suffit de leur fournir un électron pour que ces peroxydes deviennent des radicaux des plus actifs. Cet électron peut être fourni par exemple par un atome métallique de transition tel que le fer. Lors de la réaction de Fenton (41 à 45), l'ion ferreux (Fe²⁺) donne un électron au peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle (HO•) et l'ion ferrique (Fe³⁺).

Les oxydants peuvent certes provenir de sources exogènes, mais aussi du métabolisme cellulaire normal. En effet, lors de ces processus il y a formation de métabolites réactifs de l'oxygène tels que des peroxydes et des radicaux libres (46). Ames et al (47) rapportent que chez le rat, environ 10^{12} molécules d' O_2 sont métabolisées journalièrement par chaque cellule. Environ, deux pour-cent de ces molécules s'échappent dans un état partiellement réduit, soit, quelques 2×10^{10} molécules d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) et de H_2O_2 sont libérées dans la cellule chaque jour.

1.2 ANTIOXYDANTS

Pour contrecarrer les effets toxiques des oxydants endogènes, la cellule peut procéder à la simple réparation après lésion, et/ou faire appel à de nombreuses molécules et systèmes antioxydants qui agissent en complémentarité et même en synergie.

Parmi les antioxydants cellulaires, notons les non catalytiques et les enzymatiques. Les non catalytiques sont, entre autres, l' α -tocophérol, le β -carotène, le glutathion, l'acide ascorbique. Les enzymatiques sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) dépendante et non-dépendante du sélénium (48, 49, 50), la glutathion réductase (GSSG-R) (51). Cette liste n'est pas exhaustive. Il existe aussi des antioxydants extracellulaires telles que la céruloplasmine, l'albumine, l'urée, la bilirubine (52), etc.

Parmi tous ces antioxydants, le glutathion joue un rôle central. Lorsqu'il donne un électron, le glutathion devient radicalaire (GS^\bullet), mais sa réactivité est telle qu'il réagira spontanément avec un autre GS^\bullet pour former le disulfure GSSG non radicalaire et stable, donc non oxydant. Sa haute concentration intracellulaire, avoisinant le mM (53, 54), et son ubiquité en font une molécule antioxydante incontournable (55, 56). C'est en la comparant aux autres antioxydants que l'on peut apprécier son rôle clé, véritable molécule chef d'orchestre.

La molécule membranaire (lipophile) α -tocophérol arrête les réactions en chaîne de peroxydation dans la membrane plasmique

en donnant facilement un électron au radical libre pour le réduire. Ainsi, la vitamine E devient radicalaire et réagit vivement avec un semblable pour devenir la forme oxydée de la molécule. Elle a une haute efficacité si elle est constamment régénérée par le glutathion et/ou l'acide ascorbique (57, 58). Cependant, l'ascorbate devient radicalaire en donnant un premier électron, et c'est en perdant un second électron qu'il devient le déshydroascorbate stable (57). Ceci lui confère un statut particulier parmi les molécules antioxydantes telles que définies au premier paragraphe de la page huit. Le glutathion est aussi impliqué dans le recyclage de l'acide ascorbique (59, 60). Chez l'humain, l'ascorbate et l' α -tocophérol sont des vitamines tandis que le glutathion ne l'est pas.

La SOD, comme son nom l'indique, dismute le $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Le glutathion peut aussi réduire l'anion superoxyde (61). La catalase réduit deux molécules de peroxydes d'hydrogène en eau et oxygène. Cependant, le H_2O_2 est davantage réduit par la GPx que par la catalase. En effet, le K_m de la peroxydase pour le H_2O_2 est de 8 μM (62) tandis que celui de la catalase est de 1,1 M (62). Cette haute affinité de la GPx en fait la voie privilégiée pour éliminer ce peroxyde (63). De plus, la catalase est peroxysomiale tandis que le GPx est cytosolique. Différentes études (64, 65) ont comparé l'importance relative de la catalase et du GSH face à un apport de H_2O_2 . Parce que le GSH est un cofacteur essentiel de la GPx, les cellules mourraient rapidement dans un milieu où la régénération du GSH était inhibée. À l'inverse, avec un inhibiteur

de la catalase, la viabilité cellulaire était maintenue. Ces expériences démontrent que le système glutathion est essentiel à la survie de la cellule face à un oxydant tel que le H_2O_2 tandis que la catalase ne l'est pas.

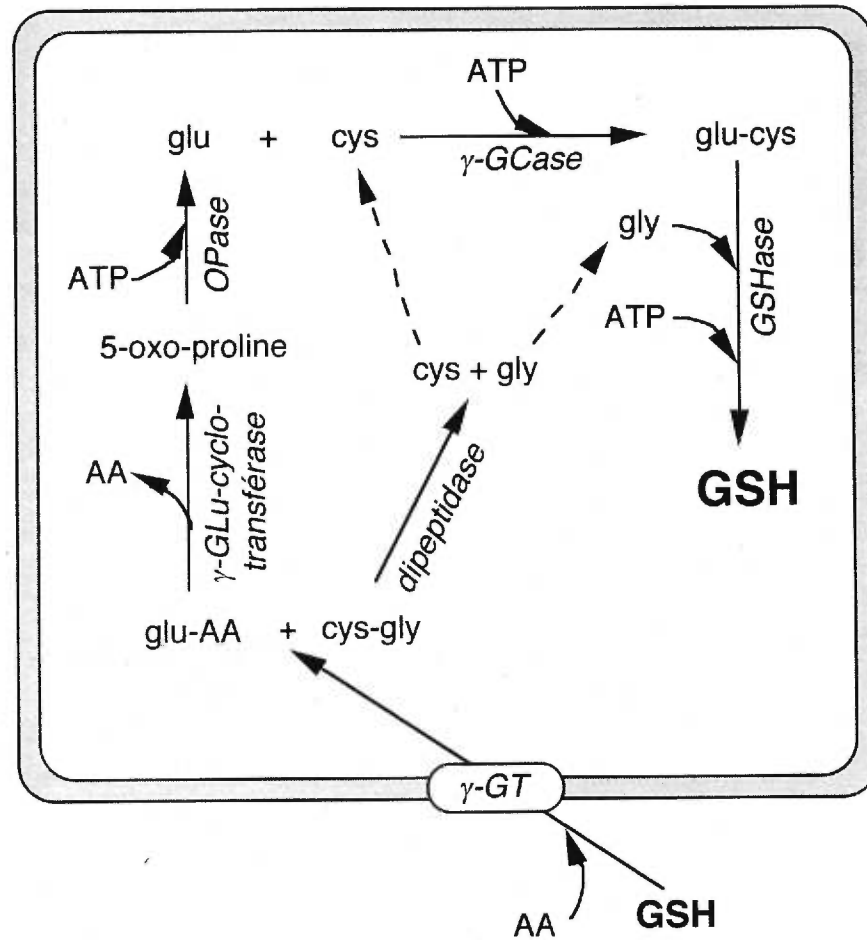
1.3 GLUTATHION

L'apparition du glutathion dans l'évolution a probablement coïncidé avec le début de la respiration aérobie. Le fait qu'il existe des êtres vivants en anaérobie qui n'ont pas de glutathion (66, 67), suggère fortement que le glutathion ait d'abord une fonction en relation avec l'oxygène. Toutes les cellules aérobies, tant procaryotes qu'eucaryotes, nécessitent du glutathion pour leurs fonctions normales. On le retrouve à des niveaux mM dans presque tous les tissus des mammifères. Il a été décrit pour la première fois à la fin du siècle dernier. En 1888 les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences publiaient une communication dans laquelle De Rey-Pailhade (68, 69) nommait «*Philothion*» une molécule du vivant ayant un hydrogène labile. Trente-trois ans plus tard F. G. Hopkins (70) décrivit cette molécule comme étant un dipeptide formé de l'acide glutamique et de la cystéine. Ce dipeptide pouvait être réduit ou oxydé dans les tissus vivants. En s'inspirant du «... *historic Philothion*» qui avait la même terminaison que «*peptone*», lequel désignait les peptides simples, et en se souvenant que le dipeptide contenait un acide glutamique lié à un composé soufré, il proposa le nom de «*Glutathione*».

En fait, le glutathion est un tripeptide, le γ -glutamylcystéinyglycine. Il a comme propriétés biochimiques distinctives une liaison gamma entre l'acide glutamique et la cystéine ce qui le rend réfractaire à toute attaque par des protéases, et une fonction thiol qui lui confère son activité. Le métabolisme du glutathion a été bien décrit par Meister (67, 71 à

79) comme faisant partie du cycle γ -glutamyle (FIGURE 1, page 18). Ce cycle a d'abord été décrit comme étant un mécanisme actif de transfert d'acides aminés dans la cellule, nécessitant trois molécules d'ATP. En effet, le glutathion extracellulaire est dégradé par la γ -glutamyltranspeptidase, une ecto-enzyme, ancrée dans la membrane cellulaire mais baignant dans le milieu extracellulaire. Cette enzyme transfère le groupement γ -glutamyle du GSH à un autre acide aminé produisant ainsi les dipeptides γ -glutamyl-acide aminé et cystéinyglycine. Ces deux derniers sont récupérés par la cellule où une dipeptidase (80) agira sur le cystéinyglycine tandis que la γ -glutamyl-cyclotransférase libérera le nouvel acide aminé du complexe γ -glutamyl-acide aminé tout en formant le 5-oxo-proline. Ainsi, le nouvel acide aminé est incorporé dans la cellule. Ce cycle se termine par une nouvelle synthèse de glutathion. Trois enzymes interviennent dans cette synthèse, utilisant chacune une molécule d'ATP. La 5-oxo-prolinase modifie le 5-oxo-proline pour en régénérer l'acide glutamique, tandis que la γ -glutamylcystéinyle synthétase reforme le dipeptide γ -glutamylcystéine lui-même co-substrat avec la glycine de la glutathion synthétase.

Figure 1. Cycle gamma-glutamyle



GSH : glutathion

glu: L-acide glutamique

gly : glycine

cys : L-cystéine

AA : acide aminé

OPase : 5-oxo-prolinase

gamma-GCase : gamma-glutamylcystéine synthétase

GSHase : GSH synthétase

gamma-GT : gamma-glutamyltranspeptidase

gamma-Glu-cyclo-transférase : gamma-glutamylcyclo-transférase

Le glutathion intervient dans bien d'autres mécanismes. Une des voies de détoxification est la conjugaison d'un groupement glutathion par la glutathion S-transférase (GST) pour en faire une molécule d'acide mercapturique facile à excréter par la voie urinaire ou biliaire (81). Ce même type d'enzyme intervient aussi dans la bioactivation de certaines molécules, telles que le leucotriène C₄, en lui fixant une molécule de glutathion. En fait, la glutathion S-transférase appartient à une famille de plusieurs isozymes ayant des spécificités d'espèces et de tissus (82 à 87). La conjugaison du groupement glutathionyle sur une molécule par la GST est considérée comme étant une "consommation" du GSH. Donc, la cellule doit en synthétiser de nouveau.

Le glutathion est un bon donneur d'électron (ou d'hydrogène) et cette propriété le rend cofacteur de bien des enzymes. Par exemple, la prostaglandine (PG) E₂ isomérase utilise une molécule de GSH comme cofacteur pour la formation de PGE₂ à partir de la PGH₂; de même, la formation de PGF_{2α} nécessite deux molécules de GSH (88). La molécule de GSH qui perd un électron devient oxydée et forme spontanément le disulfure de glutathion (GSSG). Utilisant cette même propriété d'être facilement oxydable, le GSH intervient dans une des voies métaboliques des plus importantes (FIGURE 2, page 22), soit celle de la réduction en alcool d'une grande gamme de peroxydes par des peroxydases. Ces peroxydes peuvent provenir autant d'une source endogène qu'exogène. Les processus métaboliques normaux de la cellule produisent des métabolites réactifs de l'oxygène, dont le H₂O₂, qui peuvent

oxyder des lipides membranaires et générer des peroxydes organiques. Comme exemple de source exogène, nommons la nutrition parentérale qui contient des quantités appréciables de H_2O_2 (11).

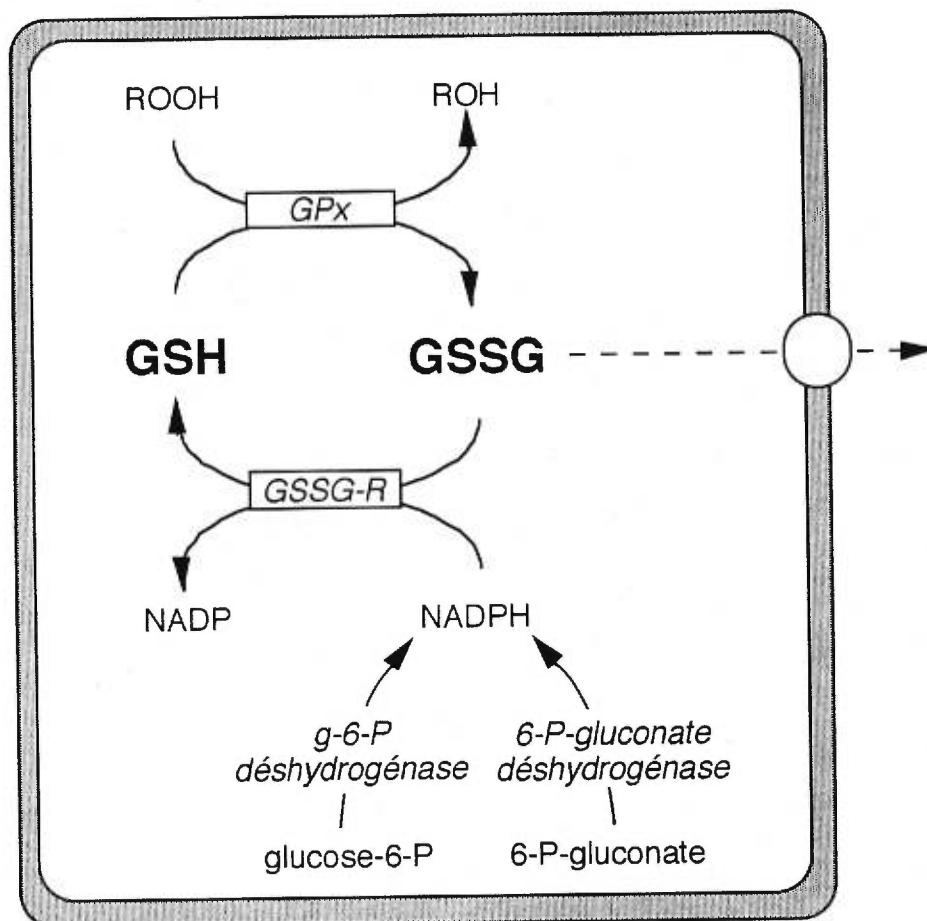
C'est ainsi que le glutathion en tant que donneur d'électrons passe de la forme réduite (GSH) à la forme oxydée (GSSG). Ce dernier aussi est cytotoxique puisqu'il modifie le ratio rédox (GSSG/GSH) de la cellule. En effet, lorsque ce ratio est modifié, une grande variété de protéines passent d'un statut activé à inactivé, ou l'inverse. Et ce, tant pour des récepteurs que pour des protéines impliquées dans le métabolisme même de la cellule. Face à un stimulus oxydant, afin de maintenir son ratio rédox la cellule doit augmenter son niveau de GSH ou se départir du GSSG formé. Certes il existe une exportation active de GSSG (89, 90, 98), mais ceci constitue une perte pour la cellule qui doit à nouveau utiliser de l'énergie (ATP) pour synthétiser de nouvelles molécules de GSH ou en importer. Pour pallier à ce coût énergétique, la cellule possède une voie de recyclage qu'est la glutathion réductase (GSSG-R) (FIGURE 2, page 22). Cette dernière utilise le NADPH fourni par la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase du cycle des pentoses phosphates (99) pour régénérer le GSH à partir du GSSG. Cependant, ce NADPH d'origine cytosolique ne peut traverser les membranes de la mitochondrie (100). Le NADPH mitochondrial (101) est généré à partir du NADH par trois principales enzymes: l'enzyme malique, l'isocitrate déshydrogénase et la transhydrogénase (100). Lorsque l'activité de la peroxydase

dépasse la capacité régénératrice de la GSSG-R, la cellule exporte son GSSG (102, 103). Cette situation peut s'observer lorsque la cellule est mise en contact avec un peroxyde. Visarius *et al* (104) ont démontré avec un modèle de cellules du tube proximal du rein de rat, que la transformation de GSH en GSSG et son exportation étaient proportionnels à la concentration de TBH dans le milieu. Le transporteur de GSSG a été récemment décrit comme étant une glycoprotéine membranaire dépendante de l'ATP pour son action et ayant un Km d'environ 90 μ M pour le GSSG, le GSH n'étant pas un substrat pour ce transporteur (105).

Il est certes bien connu que la disponibilité en cystéine est l'étape limitante pour la synthèse du GSH (106, 107). Mais l'apport majeur de cystéine demeure le glutathion lui-même. En effet, c'est par l'action de la γ -glutamyltranspeptidase sur le glutathion extracellulaire que la cystéine devient disponible pour la synthèse de GSH (108, 109). Le glutathion circulant, de l'ordre du μ M (110, 111), provient principalement du foie. En fait, le foie possède deux types de transporteurs de glutathion: un canaliculaire et un sinusoidal. Le transporteur canaliculaire est dépendant de l'ATP (112), et il exporte préférentiellement la forme réduite du glutathion dans la bile, mais lorsque l'hépatocyte subit un stress oxydant, la part de GSSG exporté par ce transporteur est plus élevée (102). Le deuxième type est responsable du transport du GSH vers ou en provenance, du sinusoïde. Effectivement, ce transporteur, dépendant de l'ATP (102), est bidirectionnel selon l'état rédox à l'extérieur de la cellule (113). Face à un environnement réducteur, il y a transport de GSH vers le

sinusoïde; face à un milieu oxydant, l'exportation est inhibé et l'import augmente (113).

Figure 2. Système GPx - GSSG-R



GSH : glutathion

GSSG : disulfure de glutathion

ROOH : peroxyde

ROH : alcool

GSSG-R : glutathion réductase

GPx : glutathion peroxydase

glucose-6-P : glucose-6-phosphate

6-P-gluconate : 6-phosphogluconate

La présence de ces deux transporteurs de GSH n'est pas spécifique au foie. En effet, l'import actif de GSH est rapporté dans plusieurs tissus tels que la barrière hémato-encéphalique (114, 115), l'intestin grêle (116), des astrocytes (117), des cellules alvéolaires de type II du poumon (118, 119) et plusieurs lignées cellulaires (120). Cependant, d'autres équipes utilisant du GSH marqué au soufre 35 ou en double marquage (soufre 35 + tritium) et / ou un inhibiteur de la synthèse du GSH, ont conclu à l'absence de transporteur notamment dans des cellules endothéliales d'artères pulmonaires (121), des cellules alvéolaires de type II du poumon (121) et des cellules épithéliales de la rétine (122). La mitochondrie est un organel qui dépend beaucoup du système glutathion pour la détoxification de ses métabolites réactifs de l'oxygène. Puisqu'elle est dépourvue des enzymes pour la synthèse du GSH, elle dépend de son import. La mitochondrie possède un transporteur de GSH dépendant de l'ATP (123, 124). Notons qu'environ 10 à 20% du glutathion total de l'hépatocyte est situé dans la mitochondrie. (125).

Malgré la présence de transporteurs spécifiques, l'activité de la γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) sur le glutathion plasmatique a été démontré nécessaire pour l'accroissement de la concentration de glutathion au poumon (126, 127). Sans départager la responsabilité de chacun des deux systèmes, essayons tout de même de dégager le rôle ou l'importance de chacun pour le maintien du glutathion intracellulaire. Ballatori *et al* (128) ont décrit un transporteur canaliculaire de basse affinité pour le GSH et un autre à haute affinité. Leur K_m sont, en moyenne,

respectivement de 17,4 et 0,24 mM. Ils ont aussi décrit un phénomène similaire dans la mitochondrie, avec des K_m de 5,4 et 0,06 mM. Le K_m de la γ -GT pour le glutathion est d'environ 10 μ M (129). La concentration de glutathion varie entre 1 et 10 mM dans la cellule, et entre 1 et 10 μ M dans le plasma (110, 111). Ce jeu de K_m et de concentrations suggère que la γ -GT est plus utile pour lier le glutathion plasmatique, tandis que le transporteur à haute affinité est utile pour lier le glutathion cytosolique. Une interprétation possible est que le foie déverse du GSH dans le plasma, que certains tissus tels que le poumon utilisera ce glutathion via sa γ -GT pour sa propre synthèse de GSH, et que d'autres cellules utiliseront les deux systèmes. Sachant très bien que le glutathion présent dans le liquide tapissant les alvéoles pulmonaires agit comme première ligne de défense contre un environnement oxydant, le transporteur de GSH des cellules épithéliales pulmonaires est peut-être très utile pour enrichir ce liquide en glutathion. Il y a donc une collaboration inter-organe. Le foie produit et exporte dans la circulation sanguine de grandes quantités de GSH (106), et les tissus ayant un haut taux de γ -glutamyltranspeptidase, utilisent davantage ce glutathion de provenance hépatique pour leur propre synthèse de GSH intracellulaire. Il y a un producteur, le foie, et des «consommateurs» dont les principaux sont les reins, les poumons et l'endothélium vasculaire (106, 126, 127, 130).

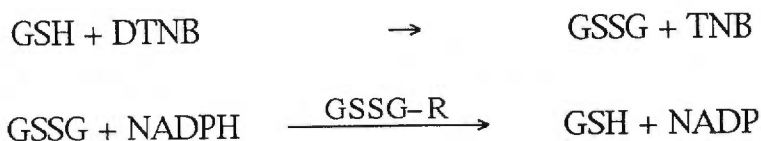
La source de cystéine hépatique est bien sûr l'alimentation, mais aussi la méthionine. En effet, le foie peut transformer la

méthionine en cystéine par la voie de la cystathionase (131, 132).

1.3.1 MÉTHODE DE DOSAGE UTILISÉE

La mesure du glutathion est basé sur la réduction de l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) en acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) par la fonction thiol (133) du glutathion. L'utilisation de la glutathion réductase (GSSG-R) permet d'obtenir la spécificité enzymatique et un seuil de détection très bas (Figure 3).

Figure 3 : Dosage du glutathion.



le TNB absorbe à 412 nm

En utilisant des concentrations saturantes de DTNB et de NADPH, et un ajout de GSSG-R exogène, la vitesse d'apparition du TNB est dépendante de la quantité de GSSG + GSH dans le milieu. L'utilisation de GSSG à des concentrations connues, permet de quantifier fidèlement le glutathion total (oxydé + réduit). L'accumulation de TNB amplifie la réponse (absorbance) d'une façon telle, que le seuil de détection est très bas, d'environ 20 pmoles de glutathion. Ceci équivaldrait à la concentration obtenue dans 50×10^3 cellules d'aspirats endotrachéaux. Cette

limite a été calculée à partir d'échantillons provenant de cinq enfants dont l'âge moyen à leur naissance était de 30 semaines de gestation. Le dosage avait une linéarité excellente ($r^2 > 0,97$) avec le nombre de cellules.

La technique est décrite sous les rubriques «*MATERIALS AND METHODS*» des deux premiers articles constituant le corps de la thèse (pages 88 et 112). Notons toutefois, que le tampon TRIS a été choisi parce que sa concentration n'influçait pas les K_m de la GSSG-R contrairement au tampon phosphate (FIGURE 5, page 62). De plus, le pH de 7,6 permettait une meilleure solubilisation du DTNB.

Puisque les cellules utilisées provenaient d'aspirats endotrachéaux, il était intéressant de connaître le ratio GSSG/GSH, et de possiblement le corrélér avec la charge oxydante, caractérisée par la FiO_2 , reçue par ces enfants. Cependant, la méthode décrite ci-dessus ne permet pas de discriminer le GSH du GSSG. Toutefois, ceci peut être obtenu en utilisant des agents se liant de façon covalente à la fonction thiol. Deux composés sont couramment utilisés: le N-éthylmaléimide (NEM) et le 2-vinylpyridine (2-VP). Pour ce faire, un échantillon est aliquoté en deux parts. L'une servant à la quantification du glutathion total, l'autre étant traitée avec un de ces deux agents chimiques (NEM, 2-VP) avant la détermination du glutathion. La valeur obtenue en utilisant cet agent chimique reflète le GSSG. La différence entre les résultats des deux parts équivaut au GSH. L'agent alkylant doit réagir rapidement, avant que le glutathion ne

s'oxyde, et ne doit pas interférer avec le dosage. Le NEM réagit rapidement, en quelques minutes, mais il doit être enlevé du milieu avant le dosage. Le 2-VP réagit plus lentement, allant jusqu'à quelques heures, mais ceci lui permet de ne pas interférer avec le dosage. Puisque la méthode utilisée pour le dosage du glutathion était basée sur celle décrite par Griffith (134) qui préconise l'utilisation du 2-VP, ce dernier a été utilisé. Nos conditions optimales correspondaient à une incubation de deux heures à 4 °C en présence de 50 mM de 2-VP dissout dans le diméthylsulfoxyde (en concentration finale de 5%). Ces conditions ont permis un recouvrement total du GSSG ajouté, et une détection nulle du GSH ajouté.

En préliminaire, la détermination du ratio GSSG/GSH a été recherchée dans 6 échantillons de cellules d'aspirats endotrachéaux. L'âge de gestation de ces enfants à leur naissance était de 31 ± 1 semaines. La proportion moyenne de GSSG était de $6,3 \pm 2,4$ %. Le nombre moyen de cellules au dosage était de $4,8 \pm 1,1$ millions. Dans dix-sept autres échantillons avec environ un million de cellules au dosage, les taux de GSSG étaient sous le seuil de détection. Selon la FIGURE 5 de la section 2.2 (page 133), pour un enfant de 30 semaines de gestation, le niveau de glutathion varie entre 150 et 200 pmoles / 10^6 cellules. Alors, 6,3 % de ces concentrations correspond à 9,5 et 12,6 pmoles de GSSG / 10^6 cellules. Soit en deçà du seuil de détection pour le dosage (20 pmoles) avec un million de cellules. Il aurait fallu plus de 2 millions de cellules au dosage pour pouvoir utiliser cet outil. La fréquence d'obtention des aspirats endotrachéaux avec ce nombre

de cellules était de 9 sur 50. Donc, la recherche d'une possible corrélation entre ce ratio et la FiO_2 , a été abandonnée. La section 2.2.3 «*MATERIALS AND METHODS*» du deuxième chapitre, pages 112-113, fait état de cette étude pilote.

1.4 SYNTHESE DE GSH

La synthèse de GSH se fait en deux étapes (voir FIGURE 1 page 18). À la première, la γ -glutamylcystéine synthétase catalyse la formation du lien γ -peptidique entre l'acide glutamique et la cystéine. Par la suite, la glutathion synthétase ajoute la glycine au résidu cystéinyle.

1.4.1 γ -GLUTAMYL CYSTÉINE SYNTHÉTASE

1.4.1.1 STRUCTURE

La γ -glutamylcystéine synthétase (L-glutamate-L-cystéine ligase; EC 6.3.2.2) est la première des deux enzymes intervenant dans la synthèse du glutathion. Cette protéine cytosolique (135) est formée de deux sous-unités. Selon différentes études, les deux chaînes ont un poids de 72 à 78 kD et de 24 à 32 kD (136 à 141). La sous-unité de 72-78 kD est responsable de l'activité de l'enzyme (138, 139, 142, 143). Il est bien connu que le glutathion a une action inhibitrice sur l'enzyme (144, 145, 146), mais en fait, c'est la sous-unité lourde qui est inhibée (138, 139). La chaîne légère, quant à elle, semble avoir une propriété régulatrice sur la capacité catalytique de la chaîne lourde. Elle modifie probablement l'affinité de la chaîne lourde pour le substrat ainsi que sa sensibilité à l'action inhibitrice du GSH (142, 143, 147). D'ailleurs, il a été démontré que l'holoenzyme avait un K_m apparent de 1,4 mM pour le glutamate, tandis que la sous-unité lourde avait un K_m de 12,4 mM pour le même acide aminé (147).

Huang *et al* (147) ont suggéré que les deux sous-unités pourraient être associées mais pas nécessairement liées par un pont disulfure. Que l'enzyme soit sous forme oxydée (les deux sous-unités liées entre elles par un pont disulfure (139, 143)) ou réduite (les deux sous-unités libres l'une de l'autre), l'activité catalytique s'en trouvera modifiée. Une étude utilisant des cultures de cellules V79 d'hamster chinois a démontré que l'ajout de 200 μM de H_2O_2 stimulait l'activité de l'enzyme (148). Cette augmentation d'activité était transitoire et n'était pas due à une synthèse protéique ni à la formation d'un radical libre. Cependant, l'ajout de catalase ou de dithiothréitol empêchait la stimulation par le peroxyde. Les auteurs ont conclu qu'un environnement oxydant était nécessaire pour maintenir l'activité de la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCCase). En comparant l'activité de la γ -GCCase provenant du foie (60 % sous forme réduite) à celle dérivant du rein (30 % sous forme réduite) de rat, Chang *et al* (143) ont démontré que la forme réduite de l'enzyme était davantage inhibée par le GSH que la forme oxydée, et cela avec un même K_m pour le glutamate (1,4-1,5 mM).

Il existe une grande variabilité entre organes, et selon l'espèce, pour la présence des deux sous-unités, de même que pour le type de lien entre elles (143, 149). Cette discordance entre la présence des deux chaînes peut expliquer la variation du K_m apparent de la γ -GCCase pour le glutamate: 1,4 à 1,8 mM (136, 143, 147, 150) vs 0,3 mM (141) et même, 0,03 mM dans une lignée cellulaire de tumeur (Human malignant astrocytoma) (136). Mais cela reste à

être prouvé. Néanmoins, le rôle exacte de la chaîne légère sur l'affinité de la γ -GCCase pour le glutamate, la cystéine, l'ATP ainsi que pour le GSH reste à être précisé.

En étudiant l'ADN complémentaire (ADNc) de chacune des chaînes, il a été démontré que les séquences de nucléotides et d'acides aminés déduites avaient une similitude de plus de 80% entre celles provenant de tissus humains et celles dérivant du rein (137) et du foie de rat (149). Par opposition, la similitude avec l'enzyme provenant d'E. coli est pratiquement absente, moins de huit pour-cent (137, 138). Il n'y a aucune homologie entre les ADNc des deux chaînes (149).

1.4.1.2 MÉCANISME CATALYTIQUE

La γ -GCCase catalyse la formation du dipeptide γ -glutamylcystéine. Elle requiert l'utilisation d'une molécule d'ATP et d'ions divalents tels que le Mg^{++} . La présence d'ATP est nécessaire pour former la molécule intermédiaire γ -glutamyl-phosphate-enzyme (151, 152) avant la formation du lien γ -peptidique avec la cystéine. C'est en utilisant des substrats qui ne peuvent être liés à la cystéine que des chercheurs ont mis au point des molécules qui bloquent l'enzyme à son état intermédiaire (151, 153, 154). Ces inhibiteurs sont irréversibles (153). Le plus connu, car efficace et spécifique, est le buthionine sulfoximine (BSO) (76, 107, 152, 154). Si le BSO est l'inhibiteur exogène le plus connu, *in vivo*, le GSH est un inhibiteur important (140, 146). D'ailleurs, la γ -GCCase est dite

étape limitante de la synthèse du glutathion à cause de cette inhibition rétroactive du GSH sur l'enzyme (76, 79, 155), le K_i serait de 0,44 à 0,50 mM dans l'érythrocyte de mouton (140). Sachant que le niveau habituel de GSH dans les tissus est de l'ordre du mM, il devient évident que l'inhibition partielle de la γ -GCCase soit à peu de chose près, constante (76, 107). Le GSH n'est pas la seule molécule ayant une fonction thiol possédant cette capacité inhibitrice. La cystamine (2,2'-dithiobis-(éthylamine)) inhibe aussi l'enzyme (156, 157). Puisque cette inhibition est réversible, il est probable que ces molécules interfèrent avec le groupement thiol de l'enzyme qui est essentiel à la catalyse (152). Mais ceci reste à être démontré. Selon l'espèce, la présence de thiol n'est pas nécessairement requise pour l'activité catalytique de la γ -GCCase. Par exemple, l'activité de l'enzyme de *E. coli* ne nécessite pas de thiol sur la protéine (152). Cette variabilité démontre l'existence de différents modes d'action de l'enzyme selon l'espèce (*E. coli*, amphibien, mammifère) (135, 152, 158).

La disponibilité de la cystéine, dont la concentration *in vivo* avoisine le K_m de la γ -GCCase pour celle-ci (159), 0,2 - 0,35 mM (147, 159), est bien souvent cité comme étant le facteur limitant dans la synthèse du glutathion (106). Ceci est surtout observé dans le cas de malnutrition, 2) d'alimentation parentérale déficiente en cystéine, 3) des jeunes enfants, incluant ceux nés prématurément, dont la voie de la cystathionase est immature (131, 132) restreignant ainsi l'utilisation de la méthionine comme précurseur de cystéine.

1.4.1.3 ACTIVITÉ

L'activité enzymatique diffère grandement entre espèce et tissus (155, 158, 160, 161). Ceci peut être dû à un mécanisme d'action différent, ou encore, à la variabilité de la présence des deux sous-unités de l'enzyme ainsi qu'à leur mode de liaison. De plus, l'utilisation d'unité (moles / minute) rapportée par des dénominateurs différents (par mg de protéine; ou par g de poids sec; ou par g d'Hb; ou par kg de poids humide; ou par million de cellules) rend toutes comparaisons très difficiles. Cependant, ce qui est intéressant dans la perspective de la synthèse du glutathion est le ratio de l'activité de la γ -GCCase sur celle de la GSHase. Il est toujours positif et il varie entre 1,3 et 8 (moyenne \pm s.e.m. = $3,9 \pm 1,0$; n=6) que cela soit dans l'érythrocyte, le foie ou le poumon (155, 160, 162, 163, 164).

Tenant compte du fait que l'activité de la γ -GCCase est inhibée par le GSH, il est difficile de déterminer la vraie étape limitante de la synthèse du GSH. Il est vrai que la levée de l'inhibition de la γ -GCCase, par une chute du GSH, suffit à augmenter le niveau de GSH cellulaire. Cependant, il a été démontré que dans l'érythrocyte humain la relation entre la concentration de GSH et l'activité de la GSHase était significative ($r^2=0,85$, n=50) tandis que celle avec la γ -GCCase ne l'était pas ($r^2=0,13$, n=30) (164).

1.4.1.4 RÉPONSE À L'AGRESSION OXYDANTE

D'une façon générale, il est admis que lorsque la cellule subit une agression oxydante au point d'en perdre son glutathion (le GSSG

est exporté), l'activité de la γ -GCCase est stimulée et ainsi, le taux de GSH remonte et peut même dépasser légèrement la concentration retrouvée dans les cellules témoins. Il y a deux explications possibles à ce phénomène. La première est que l'action inhibitrice du GSH sur l'enzyme est levée, ou partiellement levée, due à la chute de l'inhibiteur. Normalement, sans agression, la γ -GCCase n'oeuvre qu'à 20% de sa capacité (76). La seconde explication est que face à un oxydant, la cellule peut synthétiser davantage d'enzymes. Ceci fut mis en évidence entre autres par l'équipe de Shi, Iwamoto et Forman (142, 159). Ils ont utilisé des cultures de pneumocytes-types II de rat et des cultures de cellules endothéliales de l'artère pulmonaire bovine. Ces cellules étaient exposées ou non à des agents induisant soit une chute de glutathion (par le menadione), soit une production soutenue de peroxydes d'hydrogène et d'anions superoxydes (par le 2,3-diméthoxy-1,4-naphthoquinone). L'augmentation du contenu cellulaire de GSH était jumelée à une augmentation de l'activité de la γ -GCCase, de l'ARN messager codant pour la chaîne lourde de l'enzyme et de la quantité de protéines de 73 kD. Suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D, et de la traduction, la cycloheximide, ils ont émis l'hypothèse qu'un oxydant tel que l'anion superoxyde et/ou le H_2O_2 , active la transcription du gène codant pour la chaîne lourde de la γ -GCCase via un élément du type ARE (Antioxidant Response Element). Dans la levure (165), le facteur de transcription Yap-1 est responsable de la modulation de la transcription du gène GSH1 codant pour la γ -GCCase. Ce facteur se lie à l'élément YRE (Y ap-1

Response Element) de l'ADN. YRE diffère de ARE seulement en position 11 et 12 (165).

1.4.2 GLUTATHION SYNTHÉTASE

1.4.2.1 STRUCTURE

La glutathion synthétase (γ -L-glutamyl-L-cystéine:glycine ligase, EC 6.3.2.3) de rein de rat a été bien étudiée par l'équipe de A. Meister. Cette protéine d'environ 118-120 kD (145, 166, 167) est composée de 2 sous-unités identiques de 59 kD dans le rein du rat (145, 166), tandis que celle provenant de levure est constituée de 2 paires de sous-unités de 33 et 26 kD (167). Les 1,7 à 2,04 % de la masse en hydrate de carbone ne semblent pas nécessaires à son activité catalytique (166). L'ADN complémentaire de l'enzyme fut séquencé chez le rat par Huang (72). Il est composé de 1905 nucléotides dont 474 codent pour la chaîne peptidique (72). La séquence d'acides aminés ainsi déduite, n'a aucune similitude avec celle de la GSHase d'E. coli, tandis qu'elle s'apparente à environ 30% avec celle provenant de levure et à 65% avec celle de l'enzyme appartenant à la grenouille (72).

1.4.2.2 MÉCANISME CATALYTIQUE

La glutathion synthétase (GSHase) catalyse la liaison peptidique de la glycine à la cystéine du dipeptide γ -glutamylcystéine. La réaction requière de l'ATP et passe par l'intermédiaire γ -

glutamylcystéine-phosphate-enzyme (145). La recherche des conditions optimales de dosage ont permis de déterminer que l'enzyme requiert, en plus de l'ATP, des ions monovalents (K^+ , acétate $^-$) ainsi que des cations divalents tels que le Mg^{++} (167). La constante apparente de Michaelis-Menten, le K_m , est d'environ 0,7 mM (166, 167, 168) pour la glycine. Meister (166) rapporte un K_m de 33 μM pour l'ATP dans le rein de rat et de 50 μM pour la γ -glutamylcystéine, tandis que Nakagawa (167) obtient, dans la levure, 0,45 et 0,27 mM respectivement.

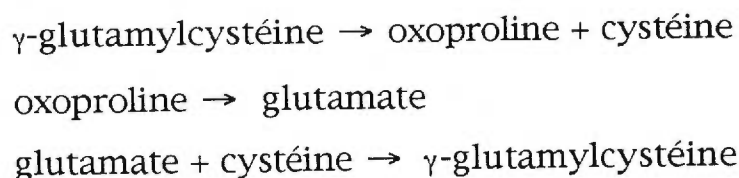
1.4.2.3 ACTIVITÉ

L'activité enzymatique varie beaucoup d'un tissu à l'autre. Par exemple, dans le rein de rat, elle est 20 fois plus active que dans l'érythrocyte du même animal (145). L'activité de l'enzyme dans le fibroblaste cutané en culture est souvent décrite en raison de l'anomalie génétique reliée à l'enzyme. Dans ces lignées cellulaires, l'activité se situe aux alentours de 35 nmoles de GSH formés / h / mg de protéines (168, 169). Cependant, le lymphocyte humain révèle une activité de 200 ± 30 nmoles / h / mg (170) tandis qu'une activité de $11,1 \pm 0,3$ est observée dans le foie de rat de 12 semaines (171).

1.4.2.4 DÉFICIENCE EN GLUTATHION SYNTHÉTASE

Il existe une pathologie clinique reliée à une déficience en glutathion synthétase. Un premier critère dans le diagnostique

est la présence d'oxoprolinurie (172 à 175). Celle-ci étant due à l'exportation par la cellule d'un excès d'oxoproline. Dans le cycle γ -glutamyle (FIGURE 1, page 18), une déficience en GSHase provoque une accumulation du dipeptide γ -glutamylcystéine. L'inutilisation de ce dernier par la GSHase déficiente, en fait un substrat de la γ -glutamylcyclotransférase. La formation d'oxoproline est d'autant plus grande que l'oxoprolinase et la γ -GCase, qui est normalement inhibée par le GSH, fonctionnent à leur Vmax. En fait, la déficience en GSHase crée une boucle dans le cycle γ -glutamyle:



De plus, le cycle γ -glutamyle introduit dans la cellule un dipeptide γ -glutamyl-acide aminé qui est aussi un substrat de la γ -glutamylcyclotransférase. L'enrichissement en substrats conduit à l'accumulation d'oxoproline.

Puisque l'oxoprolinurie peut aussi être causée par une déficience en oxoprolinase (175), il est utile, voire même nécessaire d'évaluer l'activité de l'enzyme GSHase dans des fibroblastes en culture provenant de la peau du patient (168, 169, 173); ou encore, d'en déterminer le taux dans des cellules sanguines (neutrophiles, érythrocytes) (173, 176). Relativement aux taux obtenus chez des sujets normaux, l'activité de la GSHase est d'environ 7 à 30 % (168, 169) chez le déficient homozygote (168) et de 50 à 70 % chez les hétérozygotes (168). À cette déficience,

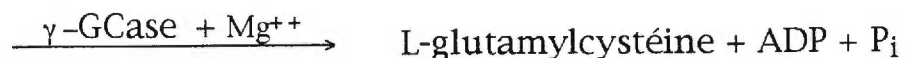
est associée une faible concentration intracellulaire de GSH pouvant être de 10 à 20% de la normale (173, 176). Malgré ce fait, le ratio GSH/GSSG conserve la même valeur que dans la cellule saine, et cela même en présence d'un oxydant tel que le tert-butylhydroperoxyde (TBH) (176).

1.4.3 MÉTHODE DE DOSAGE UTILISÉE

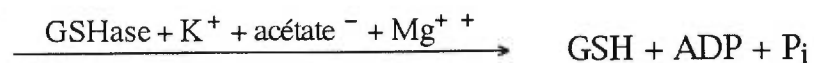
L'objectif était de développer une méthodologie pour vérifier l'hypothèse reliant la faible concentration intracellulaire de glutathion à une immaturité de la capacité de synthèse. Afin de mieux choisir les techniques à utiliser, il était important de connaître les réactions en cause (FIGURE 4) et l'ordre de grandeur de l'activité à mesurer.

Figure 4: Synthèse du glutathion.

L-cystéine + acide L-glutamique + ATP



L-glutamylcystéine + ATP + glycine



La capacité de synthétiser du GSH est étroitement liée à l'activité contemporaine des deux enzymes. C'est pourquoi l'évaluation globale de la synthèse, à partir des trois acides aminés a été

choisie. Dans le cas d'une confirmation de l'hypothèse d'une immaturité de la synthèse globale de GSH, l'activité de chacune des enzymes aurait été recherchée.

Puisque la littérature nous informe davantage sur l'activité individuelle des enzymes que sur l'activité globale, il nous a fallu estimer cette dernière. En utilisant l'équation de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

la quantité de GSH produit à partir des acides aminés peut être évaluée. Pour ce faire, il nous fallait quelques données.

V_{max} : Selon la littérature (section 1.4.2.3, page 36), l'activité de la GSHase, deuxième enzyme du système, varie entre 10 et 200 mU (U = μmoles /h/mg de protéine), et l'activité de la γ-GCase est en moyenne quatre fois plus élevée (page 33), soit 40 et 800 mU. Donc le calcul devrait inclure ces activités pour obtenir des taux des productions de GSH minimales et maximales.

[S] : Les concentrations des substrats utilisés devraient être dix fois supérieures aux K_m de l'enzyme.

Dans un premier temps, la γ-GCase produit le L-glutamylcystéine (glucys) qui sert de substrat pour la deuxième enzyme. Avec une concentration des substrats acide L-glutamique, cystéine et ATP de 10 fois supérieure aux K_m de la γ-GCase, la vitesse de réaction (v) est égale à 90% du V_{max}. La GSHase intervient en seconde

étape. Sa vitesse d'action est limitée par la quantité de glucys formée. Il était donc essentiel de connaître sa concentration dans le milieu réactionnel pour mieux évaluer la quantité de GSH formé. Le calcul est résumé dans l'encadré suivant:

Calcul de la concentration de glucys dans le milieu

Soit un milieu réactionnel comprenant un mg de protéine dans un volume d'un mL, et une durée d'incubation d'une heure.

A) V_{\max} de γ -GCase = 40 mU

$$v = 90\% \text{ de } 40 \text{ mU}$$

$$v = 36 \text{ nmoles de glucys formés.}$$

$$[\text{GluCys}] = 36 \mu\text{M}$$

B) V_{\max} de γ -GCase = 800 mU

$$v = 90\% \text{ de } 800 \text{ mU}$$

$$v = 720 \text{ nmoles de glucys formés.}$$

$$[\text{GluCys}] = 720 \mu\text{M}$$

Connaissant la concentration de glucys dans le milieu (36 et 720 μM), le K_m de la GSHase pour ce substrat (50 μM) et le V_{\max} de la GSHase (10 et 200 mU), la quantité de GSH formé a été calculée.

Elle était de 4,2 et 187,0 nmoles/h/mg de protéine. Cependant, ce calcul était valable pour des réactions séparées de chaque enzyme. C'est à dire que dans une première heure, seule la γ -GCase agissait, et dans une seconde heure, seule la GSHase était active. Ceci a un grand impact, car la quantité de glucys formé influence la vitesse d'action de la GSHase. L'accumulation de glucys sur une heure permet une activité plus grande de la GSHase qu'une utilisation contemporaine du glucys. Alors, l'estimation a été améliorée en reprenant le calcul avec des temps de réaction successifs d'une seconde. Dans ce calcul, il a été pris en considération qu'à chaque seconde, seule une partie du glucys formé est transformée en GSH. Donc, le glucys s'accumule dans le temps et, ainsi, la vitesse d'action de la GSHase varie aussi dans le temps. À l'aide de ce deuxième modèle mathématique, les taux de GSH produits sont de 2,5 et 162 nmoles/h/mg de protéine, correspondant à un taux de conversion de la cystéine en GSH de 0,07 et 4,6 %. Cette estimation était suffisante puisque l'objectif de ces calculs était de connaître l'ordre de grandeur de l'activité de synthèse, afin de mieux choisir la méthode de dosage.

Puisqu'un million de cellules équivaut à environ un mg de protéine, il nous fallait une méthode capable de détecter une formation de GSH variant entre 2 et 160 nmoles/h/ 10^6 cellules. Mais de combien de tissu disposions-nous? Sur 50 aspirats endotrachéaux, 20 contenaient un nombre de cellules supérieure à un million et 9 avaient plus de 2×10^6 cellules. En fait, le nombre moyen (\pm s.e.m., $n = 50$) de cellules était de $1,3 \pm 0,2 \times 10^6$. Il fallait donc une méthode d'évaluation de la synthèse de

GSH pour un échantillon qui ne contiendrait pas plus d'un million de cellules.

Dans la recherche d'une méthode adéquate, sept techniques furent essayées. Je les présente dans un ordre chronologique, en indiquant le principe de la méthodologie et un sommaire des résultats obtenus. Notez bien que pour limiter la perte de GSH au cours du dosage, à toutes les étapes utilisées, le tampon contenait 10 mM de L-sérine et 20 mM de borate de sodium pour inhiber la γ -GT.

1) Dosage du GSH selon la méthode de Griffith

Le principe consiste à ajouter à l'échantillon toutes les composantes nécessaires à la formation du GSH (acides aminés, ATP, ions), d'incuber une heure à 37°C, et de mesurer le GSH formé. La technique utilise le DTNB (FIGURE 3, page 25) tel que décrit à la rubrique «*MATERIALS AND METHODS*» du deuxième article, à la page 112.

La difficulté avec cette méthodologie est la réaction entre la cystéine et le DTNB. En effet, le DTNB est aussi utilisé pour la détermination des niveaux de thiol dans un échantillon (133). C'est l'utilisation de la GSSG-R qui permet une spécificité pour le glutathion.

Il a fallu diluer de 200 fois la solution afin de diminuer suffisamment le bruit de fond causé par la cystéine. Ainsi, avec un seuil de détection de 20 pmoles de glutathion dans 0,3 mL, le niveau minimal de synthèse devait être de 13,4 nmoles de GSH.

Cette limite semblait trop élevée puisque l'utilisation d'un million de leucocytes d'adulte ne permettait pas de détecter la formation de GSH en une heure.

Une alternative était d'utiliser l'acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxylique (OTC). Celui-ci entre librement dans la cellule, et est converti en cystéine par l'oxoprolinase. L'activité de cette enzyme dans des leucocytes humains a été décrite comme étant de 0,15 nmoles/h/mg de protéine (177). Comparativement à l'activité de la γ -GCase, l'activité de l'oxoprolinase serait une étape limitante dans la formation du GSH. L'utilisation de l'OTC serait donc inadéquate pour la vérification de l'hypothèse.

2) Dosage de l'ATP

Puisque la synthèse utilise deux molécules d'ATP pour former une molécule de GSH, il était tentant d'utiliser la disparition de l'ATP comme reflet de la synthèse de GSH. Le seuil de détection de cette méthode a été calculé à 15 nmoles de GSH/h. Avec un million de leucocytes d'adultes aucune activité de synthèse n'a été détectée.

3) HPLC-DEC

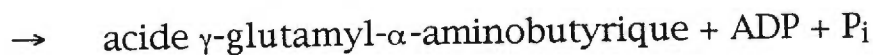
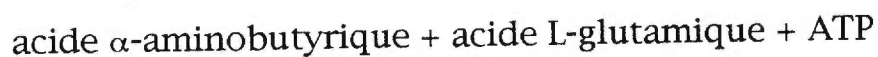
Pour contourner l'interférence de la cystéine sur le dosage du GSH, la méthode proposée par Richie et Lang (178) a été envisagée. Le GSH et le GSSG étaient séparés de la cystéine par une méthode de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC), et leur quantification par électrochimie (DEC) promettait une spécificité intéressante des molécules détectées.

Les essais ont permis effectivement de séparer GSH, GSSG, cystéine et cystine et d'obtenir un seuil de détection pour le GSH de 5 pmoles dans un volume de 20 μ L. Cependant, l'utilisation de cystéine à une concentration de 3,5 mM dans le dosage obligeait de faire une dilution de 1 sur 1000 afin de ne pas saturer la colonne et masquer la sortie de GSH. Bref, la méthode HPLC-DEC fut rejetée car le taux de conversion minimum requis pour limiter l'effet de la cystéine, était de 250 nmoles de GSH formés.

4) Ajout de GSHase purifiée

Une des difficultés rencontrées jusqu'ici était le faible niveau d'activité. Ceci était dû en bonne partie à la deuxième étape de la synthèse. En effet, puisque la concentration de glucys dans le milieu était basse, la GSHase n'agissait pas à sa pleine vitesse. Alors l'idée de mesurer seulement l'activité de la γ -GCase était une alternative intéressante. Dans les systèmes biologiques, l'activité de la γ -GCase est une étape limitante. Plusieurs situations permettant d'accroître la quantité d'enzymes induisent une augmentation de la synthèse de glutathion.

Une méthode reconnue et usuelle pour doser l'activité de la γ -GCase implique la réaction suivante.



L'avantage réside dans la stabilité du substrat acide α -aminobutyrique. L'activité enzymatique de la γ -GCase peut être

évaluée par trois techniques. Premièrement, en mesurant l'acide γ -glutamyl- α -aminobutyrique par analyseur d'acides aminés après en avoir fait un dérivé (142, 159, 179); deuxièmement, en mesurant la chute de NADH par spectroscopie lorsqu'un système régénérateur de l'ADP, impliquant la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase, est utilisé (136, 139, 140, 143, 147, 152, 154, 180, 181, 182); troisièmement, en mesurant à 720 nm le phosphore inorganique (P_i) libéré, après réaction avec le molybdate d'ammonium (143, 151, 155, 157, 166). Le seuil de détection de cette dernière technique est de 30 nmoles. En fait, ces trois méthodes avaient un seuil de détection passablement plus élevé que celui obtenu pour la détermination du glutathion par la méthode de Griffith (20 pmoles).

D'un autre côté, l'activité de la γ -GCase semblait suffisante pour utiliser la méthode de Griffith même après avoir dilué suffisamment l'échantillon pour limiter le bruit de fond dû à la cystéine. Afin d'obtenir l'activité maximale de la γ -GCase, il suffisait d'augmenter la quantité de GSHase dans le dosage de façon à ce qu'elle ne soit plus l'étape limitante.

La purification de la GSHase fut entreprise selon la méthode de Meister (166). Deux cent grammes de placenta humain furent utilisés. Les résultats de la purification étaient similaires à ceux obtenus par Meister avec 350g de reins de rats. Une activité spécifique de 40 μ moles/h/mg de protéine et de 132 μ moles/h/mL ont été obtenues comparativement à 34 et 132 pour l'équipe de Meister.

Le dosage a été repris en enrichissant le milieu de 1 U (μ moles/h) de GSHase. Ainsi, la production de GSH équivalait à l'activité de la γ -GCase. De plus, pour limiter l'effet de la cystéine sur la réduction du DTNB, la concentration de cystéine utilisée était égale au K_m , soit 0,35 mM. L'impact de cette concentration de cystéine était une activité enzymatique à 50% de son V_{max} , mais avec un bruit de fond dix fois inférieur lors du dosage du GSH.

L'activité mesurée était d'environ 100 pmoles de glucys formés/h/ 10^6 leucocytes d'adultes. Cependant, la production de GSH n'était pas linéaire dans le temps, et à la concentration utilisée, la cystéine inhibait l'activité de la GSSG-R. En soi, cette inhibition était en accord avec la littérature. En effet, le ratio rédox du milieu influence l'activité de l'enzyme. À haute concentration, le GSH est connu pour inhiber l'activité de la GSSG-R (voir section 1.6.2 «MÉCANISME CATALYTIQUE» de la GSSG-R, page 58). Au dosage, la présence de cystéine à la concentration de 10 μ M inhibait la GSSG-R d'environ 20%. Encore une fois, ce dosage fut écarté.

5) Utilisation d'un traceur radio-actif

Puisque la cystéine interférait avec l'utilisation du DTNB et du détecteur électrochimique (DEC), l'utilisation d'un substrat radio-actif couplée à une méthode efficace de séparation du produit du substrat fut envisagée. Pour éliminer la possibilité que l'intermédiaire, glucys, soit aussi radio-actif et que l'on soit obligé de séparer les trois molécules, l'utilisation de la glycine marquée

au tritium a été choisie. Connaissant l'activité spécifique de la ^3H -gly (dpm/molécule), la quantification de la radio-activité dans la fraction GSH permettait de calculer la quantité de molécules de GSH formées.

La glycine était séparée du GSH par chromatographie sur couche mince (TLC) de gel de silice (183). Après révélation à la ninhydrine, les R_f obtenus étaient de 0,42 pour la glycine, 0,67 pour la cystéine, 0,72 pour le GSSG et 0,79 pour le GSH.

Malgré l'excellente séparation, même avec $2,6 \times 10^6$ leucocytes d'adultes incubés 2 heures, aucune activité n'a été détectée. La basse incorporation de tritium dans le GSH pourrait expliquer cet échec. En effet, selon la compagnie Amersham, 94,7% de la radio-activité de la solution était du ^3H -glycine. Le bruit de fond devait être plus important que l'incorporation de tritium.

6) Utilisation du monobromobimane en fluorescence

La glutathion S-transférase catalyse la réaction entre le monobromobimane et le glutathion afin de produire le composé bimane-GSH. Ce dernier émet de la lumière à 478 nm après excitation à 385 nm (184). Sachant que le seuil de détection en fluorescence est généralement très bas, l'utilisation du monobromobimane (mBrB) était prometteur. La réaction était linéaire entre 0 et 50 nmoles de GSH et avait un seuil de détection de 300 pmoles.

Cependant, plusieurs molécules ayant une fonction thiol, telle que le dithiothréitol et la cystéine, réagissent chimiquement avec le

mBrB pour former un composé fluorescent (185, 186, 187). Cette réaction avec la cystéine était fortement influencée par le pH et le temps. Après deux minutes, à un pH de 7,0 la mesure de fluorescence correspondait à 240 unités (sur une échelle relative maximale de 1000) tandis qu'elle était à 600 unités (U) pour un pH de 7,5. Dans un tampon de pH égal à 7,3 la lecture passait de 460 à 820 U entre un temps d'incubation de 2 à 10 minutes à température ambiante. À cause de sa haute réactivité avec la cystéine, l'utilisation du mBrB a été écartée. Cependant, puisqu'une molécule voisine, le monochlorobimane (mClB), était chimiquement moins réactive avec la cystéine (188) tout en ayant la même propriété fluorescente (184, 188, 189, 190), l'espoir était encore permis.

7) Utilisation du monochlorobimane en fluorescence

Malgré que le mClB soit moins réactif avec la cystéine et au dithiothréitol (DTT), il n'en demeurait pas moins que ce problème était encore présent. Une solution envisagée correspondait à utiliser une concentration de cystéine de 0,35 mM au lieu de 3,5 mM. Avec une concentration de substrat égale au K_m , l'activité de l'enzyme correspond à 50% de son V_{max} . Cette solution m'a semblé acceptable parce que le bruit de fond était contrôlé et les valeurs de synthèse maximum pouvaient être déduites mathématiquement avec précision. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la γ -GCase, le buthionine sulfoximine (BSO), permettait de différencier l'activité de synthèse du bruit de fond. Il suffisait de séparer l'échantillon en deux, de préincuber une

moitié avec du BSO et l'autre avec le tampon sans BSO. La différence de fluorescence entre ces deux moitiés après réaction correspondait à l'activité de synthèse.

Puisque la méthode utilisée, adaptée de deux publications (184, 188), est décrite dans la rubrique «*MATERIALS AND METHODS*» (page 148) du troisième article, je ne la décris pas ici. Cependant, les conditions d'utilisation efficaces du BSO, la linéarité de la réaction et les seuils de détections sont rapportés ci-dessous.

Buthionine sulfoximine: Des leucocytes isolés de sang de cordon ont été préincubés et incubés en présence ou non de BSO. Des temps de préincubation variant entre 0, 5, 10, 20, 30, 40 et 60 minutes à 37°C avec des concentrations de BSO de 5, 10, 20, 40, et 60 mM ont été évalués. Durant cette préincubation, en plus du BSO, l'échantillon était en contact avec un tampon TRIS (50 mM) à pH 7,3 contenant 0,1 mM EDTA, 10 mM L-sérine et 20 mM borate de Na. L'inhibition de la synthèse (différence entre «avec» et «sans BSO») était maximale lorsque la préincubation avec 40 mM de BSO durait 30 minutes (TABLEAU 1, page suivante).

Tableau 1 : Effet de différentes concentrations de buthionine sulfoximine (BSO) sur l'obtention d'une activité de synthèse de GSH par des leucocytes isolés de sang de cordon d'enfants nés à terme.

[BSO] (mM)	% d'inhibition maximale
5	51,5 ± 10,0
10	74,9 ± 11,2
20	84,0 ± 15,8
40	96,3 ± 3,7
60	87,5 ± 4,7

Le BSO était utilisé en préincubation de 30 minutes à 37°C et demeurait dans l'échantillon lors du dosage. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne ± s.e.m., n = 3.

Linéarité de la réaction: La réaction était linéaire ($r^2 > 0,95$) 1) entre 10 et 120 minutes à 37°C (avec lecture de fluorescence aux 10 minutes); 2) jusqu'à une activité de 35 nmoles/h (vérifiée à l'aide d'un homogénat de foie de cochons d'Indes); et 3) jusqu'à 40 mg de protéine (homogénat de poumon de cochon d'Indes).

Limites de la réaction: En remplaçant l'échantillon par le tampon, un seuil de détection a été calculé. La limite de détection de 1,6 nmoles/h correspondait à l'activité d'un million de leucocytes isolés de sang de cordon. Donc, l'activité de synthèse a été mesurée dans les échantillons contenant plus de deux millions de cellules.

1.5 γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE

1.5.1 STRUCTURE

La γ -glutamyltranspeptidase ([5-glutamyl]-peptide:acide aminé 5-glutamyltransférase, EC 2.3.2.2) est une ecto-enzyme essentielle du cycle γ -glutamyle (FIGURE 1, page 18). Elle est composée de deux sous-unités glycosylées (191, 192). La plus légère, L, a un poids moléculaire de 22-29 kD (191, 193, 194, 195) et est liée par des interactions non covalentes (191) à la sous-unité H (196). Cette dernière, de poids moléculaire de 50-58 kD (191, 195, 196), est ancrée dans la membrane plasmique par un segment NH₂-terminal (191). Dans le poumon de rat, l'enzyme se situe du côté apical des cellules épithéliales (197).

Un polypeptide de 63-64 kD est d'abord synthétisé (195, 198) et translocalisé au réticulum endoplasmique pour recevoir des polysaccharides de mannose sur des résidus asparagine (199). Par la suite, dans l'appareil de Golgi, il reçoit d'autres oligosaccharides (195) tels que galactose, fucose et acide sialique (200). À ce stade, le polypeptide glycosylé est connu comme étant la proenzyme. Ce n'est qu'une fois ancrée dans la membrane (cytoplasmique (191), réticulum endoplasmique (195, 201) ou Golgi (191)), que cette proenzyme de 78 kD (191, 198, 201) est scindée en sous-unités L et H. La sous-unité L est le siège du site actif liant la partie γ -glutamyle du substrat (193, 194). Le traitement à la papaïne dissocie les deux sous-unités et conduit à une enzyme hydrosoluble et active (192, 202).

La glycosylation de l'enzyme est abondante et hétérogène, 157 résidus Asp sont liés à des oligosaccharides pour une proportion d'environ 4,8 molécules d'oligosaccharides par molécule de γ -GT (203). La glycosylation varie selon les tissus et influence les propriétés catalytiques de l'enzyme (204). Cette hétérogénéité de la glycosylation est la cause des bandes diffuses sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (192).

1.5.2 MÉCANISME CATALYTIQUE

Les substrats de la γ -GT sont des peptides ayant un groupement γ -glutamyle. L'enzyme lie ce γ -glutamyle pour former l'intermédiaire «glutamyl-enzyme» (205) avant de le transférer à un autre acide aminé. Les dipeptides ainsi formés, seront récupérés par la cellule par l'entremise de dipeptidases membranaires (EC 3.4.13.11) (80). Le glutathion et ses dérivés sont les substrats naturels de la γ -GT. Les K_m apparents de l'enzyme pour le GSH, le GSSG et les dérivés conjugués au glutathion tel que le GS-méthyle et le GS-sulfobromophthaléine varient de 6 μ M à 12 μ M (129). L'usage d'inhibiteurs tel l'acivicin (acide α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique) (108, 206 à 209) a mis en évidence le rôle important de cette enzyme pour le maintien des concentrations tissulaires de glutathion (108) et de cystéine (109). Le k_i de l'enzyme pour l'acivicin (ou AT-125) varie de 130 à 300 μ M, à pH 8,0 (207).

1.5.3 ACTIVITÉ

Le niveau d'activité est spécifique au tissu et à la phase du développement de l'organisme. Chez le rat adulte, l'activité (U = $\mu\text{mole}/\text{minute}$) est plus grande au rein (0,9 U/mg de protéine du culot de 100,000g (130)) qu'au poumon (8 mU) (130) et qu'au foie (3 mU) (130, 210). Cependant, au stade foetal (entre 18 et 20 jours de gestation, le terme étant à 22 jours), l'activité rénale est encore supérieur (130), mais le poumon a une activité γ -glutamyltranspeptidique inférieure à celle du foie (130). Il est à noter que plus tôt dans la gestation, 17 jours chez le rat, l'activité rénale est inférieure à celle du foie (211). Aux différentes étapes du développement du rat, le rapport "rein : poumon : foie" varie ainsi (130):

foetal (17 jours) " 2,2 : 0,08 : 1"

adulte "370 : 3,3 : 1"

De foetal à adulte, l'activité chute au foie (de $44,2 \pm 4,5$ à $2,6 \pm 0,4$ mU / mg protéine), augmente au rein (de $96,4 \pm 8,5$ à $910,5 \pm 45,7$) et au poumon (de $3,7 \pm 1,2$ à $8,3 \pm 0,9$) chez le rat (130).

Dans les lymphocytes humains d'adultes, l'activité de la γ -GT est rapportée comme étant de 330 pmoles/min/ 10^6 cellules (212).

1.5.4 RÉGULATION

Dans certaines circonstances, les glucocorticoïdes peuvent induire l'activité hépatique de la γ -GT (213, 214). Lorsque le cortisol est injecté au rat entier, l'induction est dépendante du

développement. Elle est étroitement corrélée avec la dose chez le nouveau-né, tandis qu'elle est inexistante chez l'adulte (213). Cependant, en culture, la γ -GT de l'hépatocyte provenant de rats adultes, est stimulée par le dexaméthasone (214). Puisque la cycloheximide inhibe autant la stimulation par les glucocorticoïdes que la dégradation normale (renouvellement) de l'enzyme, Edwards (214) a émis l'hypothèse que la γ -GT était sujet d'une répression et d'une induction réversibles.

Chez le rat adulte, l'utilisation de H_2O_2 ou du ménadione, un système générateur d'anions superoxydes ($\bullet O_2^-$), suggère qu'un stimulus oxydant induit la traduction et la transcription de la γ -GT (215). Chez le rat, la transcription de la γ -GT peut être modulée par quatre promoteurs différents, selon le tissu (216). Au poumon, selon le stade du développement, seulement trois de ces promoteurs (I à III) interviennent. Tandis qu'au niveau foetal (18 jours de gestation) les trois promoteurs sont utilisés, chez l'adulte seul le promoteur III est actif (216). Ces promoteurs ont la caractéristique d'être activés selon la teneur en oxygène (216). L'expression du transcrit γ -GT-ARNm-I, stimulée par une hypoxie, diminue entre le premier et le dixième jour de vie; l'expression du γ -GT-ARNm-II, qui est stimulée par trois pour-cent d' O_2 et inhibée par 21 % O_2 , disparaît dans les 24 premières heures de vie; tandis que la γ -GT-ARNm-III, la seule exprimée après 10 jours de vie, peut aussi être activée par 21 % O_2 dans des cellules provenant de foetus de 18 jours (216). L'hétérogénéité des ARNm codant pour le γ -GT se retrouve aussi chez la souris (217), le porc (218) et l'humain (219). D'autres (130) ont aussi suggéré que la

méthylation du gène codant pour l'enzyme pourrait être un facteur de régulation de son activité.

1.5.5 MÉTHODE DE DOSAGE UTILISÉE

Lors des déterminations de l'activité de l'enzyme, le substrat utilisé est surtout le γ -glutamyl-para-nitroanilide (γ -G-pNA) ainsi que le dipeptide glycylglycine comme accepteur du groupement γ -glutamyle. Ce dernier est reconnu comme étant le meilleur accepteur dans ces conditions de dosage (220). Le k_m apparent de la γ -GT pour le γ -G-pNA est de 0,9-1,9 mM (205, 207, 221), et pour la glycylglycine il est de 12,0-16,0 mM (205, 221). Tenant compte du pH optimal entre 7,6 et 8,3 (221) et des concentrations non inhibitrices de γ -G-pNA et de glycylglycine (205, 221, 222), le dosage le plus courant est celui utilisant de 4 à 9 mM de γ -G-pNA, de 75 à 120 mM de glycylglycine dans un tampon 100 mM TRIS à pH 7,6-8,0 à 37°C (205, 214, 221). Cette technique est décrite à la section «*MATERIALS AND METHODS*» du troisième article à la page 148.

Un piège à éviter est l'hydrolyse spontanée du substrat. L'utilisation d'un spectrophotomètre pouvant lire simultanément l'absorbance dans 6 cuvettes a permis de limiter ce bruit de fond. En effet, il suffisait de soustraire l'absorbance enregistrée pour la cuvette dans laquelle l'échantillon était remplacé par du tampon. La réaction était linéaire ($r^2 > 0,97$) jusqu'à, au moins, 30 minutes, et le seuil de détection était de 90 pmoles de p-nitroaniline formés/minute.

1.6 GLUTATHION RÉDUCTASE

1.6.1 STRUCTURE

La glutathion réductase (NAD(P)H:glutathion-oxydé oxydoréductase, EC 1.6.4.2) est une flavoprotéine de 100-125 kD constituée de deux sous-unités identiques de 50-57 kD (99, 223 à 229). La composition en acides aminés est similaire chez les mammifères (226, 229), cependant elle diffère de plus de 50 % d'avec celle d'E. coli (230). Des 478 acides aminés de chaque sous-unité (99), on dénombre quatre domaines (231). Le premier (résidus 19 à 157) constitue le domaine liant une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD) (223, 226, 228, 231, 232). Le second (résidus 158 à 293) est le site de liaison du NADPH (99, 231). Les 70 acides aminés suivants (résidus 294 à 364) constituent aussi un domaine associé à la liaison du FAD (99, 231). Le quatrième domaine (résidus 365 à 478) forme l'interface de l'homodimère (231). Les deux domaines liant les nucléotides NADPH et FAD auraient comme origine une duplication d'un gène (225, 233).

La structure de la glutathion réductase (GSSG-R) est bien connue (99, 225, 226, 229, 231, 234). Dans le domaine liant le FAD, les 157 premiers acides aminés (225, 231), il y a quatre résidus cystéinyles importants. La cys-2 est impliquée dans le phénomène d'agrégation de la protéine (235). En absence de thiol, la formation de tétramère et même de plus grands agrégats, est notable (224). La présence de GSH suffit à contenir l'enzyme sous sa forme dimérique. Cependant, ce résidu n'est pas essentiel

à la propriété catalytique puisque les agrégats demeurent actifs (224). Il n'est pas non plus impliqué dans le pont disulfure entre les sous-unités (99), car c'est la cys-90 qui en est responsable (225). Les résidus cys-58 et 63 sont par contre essentiels pour le caractère rédox du site catalytique (225, 231). Il est important de souligner que ceci est aussi vrai pour la seconde chaîne peptidique. De plus, les deux chaînes contribuent à chacun des deux centres actifs de l'enzyme via un résidu histidinyle de l'autre chaîne (99, 231, 235). En fait, à cause de l'apport essentiel de chacune des chaînes à chacun des deux sites actifs, et du pont disulfure les reliant, la GSSG-R doit être regardée comme étant une protéine monomérique, autant d'un point de vue biologique que physico-chimique (225).

1.6.2 MÉCANISME CATALYTIQUE

Chaque site actif est formé de l'union de 2 cavités liantes situées de chaque côté de la molécule, et séparées par l'anneau isoalloxazine du FAD (235). Une cavité lie le GSSG et l'autre le NADPH (235). Le processus catalytique consiste en un transfert d'un équivalent réducteur du NADPH (236) au GSSG en passant par le couple rédox du dithiol (cys-58 et 63) du domaine liant le FAD (235). Le NADPH se lie en premier à l'enzyme qui est sous une forme oxydée. Il y a transfert d'électron entre le nucléotide et le couple dithiol pour former une semiquinone tout en relâchant le NADP⁺. L'enzyme ainsi réduite, lie le GSSG et lui transfère l'électron. Le GSH produit est relâché et l'enzyme

oxydée est régénérée (237, 238).

La GSSG-R peut aussi utiliser le NADH comme donneur d'électron (236, 239). Par contre cette liaison est de basse affinité, $K_m=670 \mu\text{M}$ (236), et procure une activité catalytique 10 fois moindre qu'avec le NADPH (228, 240). La haute affinité de l'enzyme pour le NADPH ($K_m=2$ à $15 \mu\text{M}$) dans les tissus humains, (62, 99, 232, 236, 238, 240 à 244) dépend de la variété des acides aminés au site actif. Il est en effet possible de les changer et ainsi obtenir une préférence pour le NADH (245).

À cause de sa haute teneur en résidus cystéinyles actifs, il paraît probable que les propriétés catalytiques de la GSSG-R soient affectées par l'environnement rédox. En effet, le FAD est réductible par le NADPH, le GSH et le dithiothréitol, et oxydable par le GSSG de façon instantanée (228). L'apport ou la concentration relative de chacune de ces molécules aura un effet important sur l'activité de l'enzyme.

Le NADPH est reconnu comme étant un inhibiteur de la GSSG-R (99, 229, 238). L'inactivation est dépendante de la concentration, de la température d'incubation et du pH (229). Une fois inhibée, l'enzyme le demeure même si le NADPH est enlevé du milieu (229). De plus, il promeut l'agrégation de la protéine (238). Cependant, le GSSG (99, 229, 238) ainsi que le GSH (99, 229) à 2 mM (238) préviennent et même renversent l'inhibition. Le NADP^+ , un produit de la réaction, est aussi un inhibiteur (229, 243) compétitif (238) de l'enzyme, avec un faible K_i de 28 à $70 \mu\text{M}$ (229, 238, 243). Cette inhibition peut aussi être prévenue ou

renversée par le β -mercaptoéthanol ou le GSH (238). En fait, Lopez-Barea et Lee (229) proposent que l'auto-inactivation de la GSSG-R par le NADPH et sa protection - réactivation par le GSSG joue un important rôle régulateur *in vivo*. Cependant, puisque le GSH lui-même est inhibiteur à haute concentration, à plus de 5-6 mM (229, 238), Rosemeyer (99) suggère quant à lui, que l'enzyme doit davantage être inhibée par le GSH que par le NADPH *in vivo*.

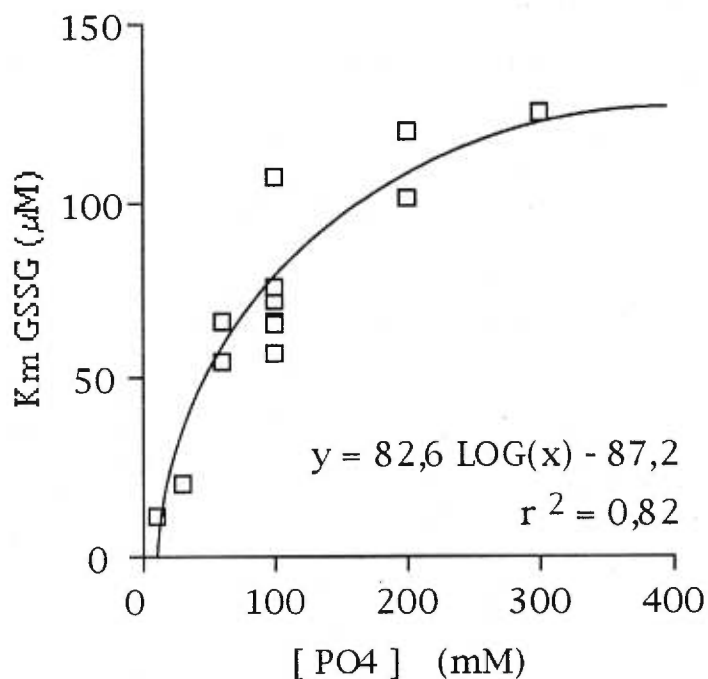
Un autre inhibiteur (62, 246, 247) fréquemment utilisé est le 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU). À concentration thérapeutique de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, il inhibe la GSSG-R (246). La carmustine (BCNU) interfère avec l'état rédox du site actif, dans le domaine liant le FAD (225). *In vitro*, un réducteur tel que le β -mercaptoéthanol protège l'enzyme (246). En fait, le BCNU diminue l'affinité de l'enzyme pour le NADPH. Le K_m pour le NADPH passe de 5 à 33 μM en présence de BCNU, tandis que celui pour le GSSG est peu influencé, passant de 62 à 45 μM . Cette modification du K_m pour le NADPH est importante en regard de sa concentration *in situ*, environ 50 μM (238). En effet, avec une telle concentration, et un K_m de 5 μM , la concentration du nucléotide n'est pas limitante pour l'activité enzymatique. Par contre, avec un K_m avoisinant la concentration du substrat, la vitesse maximale de l'enzyme chute.

Il y a certes plusieurs facteurs qui influencent l'activité de l'enzyme, cependant, *in vivo*, l'état rédox a un impact majeur. Boggaram et al (226) ont démontré que la présence de GSH dans le milieu, influençait beaucoup la cinétique de l'enzyme. Sans

GSH, le K_m pour le GSSG était de $76 \pm 8 \mu\text{M}$, celui pour le NADPH était de $21 \pm 2 \mu\text{M}$ avec une activité molaire de $21\,700 \pm 1\,400 \mu\text{moles/minute}/\mu\text{mole}$ de flavine, tandis qu'avec 2 mM de GSH (une concentration reflétant le caractère *in vivo*), les K_m étaient respectivement à 231 ± 37 et $71 \pm 11 \mu\text{M}$ avec une activité molaire de $29\,800 \pm 4\,100 \mu\text{moles/minute}/\mu\text{mole}$ de flavine. Avec des concentrations similaires à celles retrouvées *in vivo*, $[\text{NADPH}] = [\text{GSSG}] = 50 \mu\text{M}$ et $[\text{GSH}] = 1 \text{ mM}$, la GSSG-R possède 70% de son activité maximale (229).

En fait, les K_m pour le GSSG et pour le NADPH sont influencés par divers facteurs. Un de ceux-ci est la concentration de phosphate dans le milieu. Ce facteur n'influence que le K_m pour le GSSG (242, 243). À partir des données de la littérature (227, 229, 240, 242, 243), on peut établir une relation logarithmique entre le K_m et la concentration de PO_4^{2-} (FIGURE 5, page suivante). À cause de cette influence, l'activité enzymatique serait affectée négativement par la présence de phosphate (237, 238). Cependant, ce phénomène n'est pas observé en utilisant un tampon à base de TRIS. En utilisant du TRIS, le K_m pour le GSSG est d'environ $70 \mu\text{M}$ (241). La température de l'incubation a aussi une influence positive (240, 241) et linéaire (240). Les K_m pour le GSSG et le NADPH doublent, entre 25°C et 56°C (240).

Figure 5: Effet de la concentration de phosphate sur le K_m de la glutathion réductase pour le GSSG.



Les données proviennent des références 227, 229, 240, 242, 243.

D'ailleurs, la thermostabilité de l'enzyme lui confère une caractéristique très intéressante. En effet, une incubation de 8 heures à 37°C (229) ou d'une heure à 60°C n'altère pas son activité (223, 236, 242, 248). Le FAD semble être un facteur important à cette résistance, car l'incubation à 56°C de l'apoenzyme, avant l'ajout de FAD, inactive l'enzyme (240). Cependant, l'ajout de 5 μ M de FAD à l'apoenzyme avant incubation, prévient l'inactivation (240). De même, le GSSG

stabilise l'enzyme contre l'inactivation due à une incubation de 10 minutes à 80°C (229). Si cette thermostabilité est sécurisante pour les manipulations de laboratoire, il est aussi rassurant de savoir qu'une congélation de 28 jours à -20°C ou à -70°C préserve l'activité de l'enzyme (249).

1.6.3 ACTIVITÉ

L'activité de la GSSG-R érythrocytaire a été abondamment étudiée. Dans l'érythrocyte humain adulte, l'activité ($U = \mu\text{moles} / \text{minute}$) rapportée varie entre 114 et 185 $\mu\text{U} / 10^6$ cellules (241, 248, 250, 251) ou 3.5 à 13.3 $U / \text{g Hb}$ (248, 251 à 254). L'érythrocyte de rat a une activité similaire d'environ 10 à 12 $U / \text{g Hb}$. Cependant, elle est beaucoup plus élevée dans les leucocytes. Le lymphocyte, tant humain (255) que murin (256), possède une activité de près de 5 $\text{mU} / 10^6$ cellules. Exprimée par mg de protéines, l'activité de la GSSG-R est similaire entre les lymphocytes humains (64 à 92 mU) (257, 258, 259), les polymorphonucléaires humains ($51 \pm 18 \text{ mU}$) (259), le poumon de rat ($42 \pm 15 \text{ mU}$) (260) et le foie de rat (45 à 60 mU) (260). Cependant, la cellule endothéliale possède une activité moindre et différente selon le lit vasculaire: l'artère mammaire, $3 \pm 0,3$; la veine saphène, $4 \pm 0,3$; la veine ombilicale, 9 ± 1 ; le coeur, 17 ± 1 ; l'artère pulmonaire, $21 \pm 2 \text{ mU} / \text{mg de protéine}$ (261, 262, 263).

Durant la période entourant la naissance, c'est à dire de quatre jours avant la naissance jusqu'à cinq jours de vie, aucune

différence n'a été démontrée entre le rat mâle et femelle au niveau du poumon et du foie (264, 265). De même, le foie de rat adulte ne démontre pas de différence due au sexe (99, 264, 266). À l'exception des études chez le rat, peu d'auteurs ont tenu compte du sexe dans leur investigation. On sait que l'activité mesurée dans l'érythrocyte humain de nouveau-né ne diffère pas selon le sexe de l'enfant (252).

L'activité de la GSSG-R est reliée à celle de la GPx par l'intermédiaire du GSSG. Lorsque le taux de formation de GSSG par la GPx dépasse la capacité de recyclage de la GSSG-R, la cellule exporte ce GSSG pour maintenir son potentiel rédox GSH / GSSG. Ceci est d'autant plus important que lorsque la GSSG-R est inactivée par le BCNU, le tissu devient plus susceptible de perdre son glutathion face à un peroxyde (267) et même à maintenir sa viabilité face à des radicaux libres tels que générés par le système glucose + glucose oxydase (268). À ce sujet, il est intéressant de noter le ratio d'activité de la GSSG-R sur celle de la GPx. L'activité relative de la réductase semble être en proportion avec le potentiel oxydant que le tissu doit gérer. Ainsi, l'activité de la GSSG-R est supérieure dans les leucocytes: le ratio GSSG-R/GPx égale 1,7 dans les polymorphonucléaires (259) et varie entre 0,6 (259) et 3,3 (258) dans le lymphocyte. Par contre, au foie où plusieurs autres mécanismes de détoxification existent, l'activité de la réductase est plus basse, le ratio GSSG-R/GPx varie entre 0,08 et 0,3 (99, 261, 266). Dans l'érythrocyte, ce ratio passe de 1,0 chez le nouveau-né à 0,6 chez l'adulte (252).

1.6.4 RÉGULATION

Toute la question de la régulation génique de la GSSG-R demeure à éclaircir. Il est bien connu qu'il n'existe qu'un seul locus (269) du gène et qu'il se trouve sur le chromosome 8 (264, 270 à 273) dans la sous-bande 8p21.1 (274 à 277). Collinson et Dawes (230) ont démontré que dans la levure, le gène GLR1 code pour une protéine de 467 acides aminés dont le poids moléculaire déduit correspondait à 51 545 daltons. Une multicopie de ce gène, par plasmide interposé, augmentait de plusieurs fois l'activité de la GSSG-R dans la levure. Par contre, l'équipe de Cholin (278) a démontré que le transfert du gène recombinant (279) codant pour la GSSG-R dans différentes lignées cellulaires a donné des résultats difficiles à interpréter. En effet, malgré le succès du transfert, certaines lignées ne démontraient aucune différence dans l'activité de l'enzyme, tandis que d'autres exprimaient une augmentation jusqu'à 5 fois de l'activité. De ces expériences, ils suggèrent que la GSSG-R devrait être régulée au niveau post-traduction ou que la sur-expression de l'enzyme pourrait être toxique pour certaines lignées de cellules en culture.

Mais qu'en est-il de l'action d'un stimulus oxydant sur l'enzyme même? Les résultats varient selon la nature de la molécule oxydante, du système biologique et des conditions expérimentales. Des peroxydes (H_2O_2 , TBH, hydroperoxyde de cumine), à concentration variant entre 0,5 et 1 mM pour des durées d'incubation de 1 et 5 heures, n'affectent pas l'activité de la GSSG-R de cellules de hamsters chinois V79 (280) ou de

kératinocytes humains (281) en culture. Cependant, dans la levure, une incubation d'une heure avec 0,2 mM de H₂O₂ a suffi pour augmenter l'activité de la GSSG-R de 45 ± 15 % (282). De même, le fer qui est un élément important dans la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, n'affecte pas l'activité de la GSSG-R de kératinocytes en culture (281) et ce avec 0,2 mM de Fe²⁺ ou de Fe³⁺. Par contre, d'autres rapportaient soit une inhibition avec 100 µM de Fe²⁺ (283) ou 5 mM de Fe³⁺ (284), soit une stimulation de l'activité avec 7,5 mM de Fe²⁺ (284) en utilisant d'autres lignées cellulaires en culture.

Le stimulus oxydant le plus couramment rencontré chez le nouveau-né est l'hyperoxie. Chez le rat nouveau-né, l'hyperoxie sur 2 ou 6 jours stimule l'activité de la GSSG-R pulmonaire (285, 286). Cette augmentation est associée à une hausse de la quantité protéique de l'enzyme (286). Dans ces cas la quantité de GSH était aussi augmentée.

La différence entre l'apparente inaction des peroxydes et la stimulation sous hyperoxie pourrait être due à une spécificité tissulaire ou à la qualité de l'oxydant. En effet, puisque 5 mM de paraquat (générateur de radicaux libres) provoque une augmentation d'activité de la GSSG-R de 3,6 fois dans des cellules VERO en culture (284), ces données suggèrent que les radicaux libres stimulent l'activité enzymatique. De même, l'administration intrapéritonéale d'endotoxine à des souris a induit au poumon une augmentation de 55 % de l'activité de la GSSG-R, accompagnée d'une duplication de son ARNm ainsi que la quantité protéique

réagissant avec un anticorps spécifique (287). Ceci a été observé autant chez les mâles que chez les femelles. Ces auteurs suggèrent que l'action de l'endotoxine est similaire à celle du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activation de facteurs de transcription tels que le $\text{NF}\kappa\text{B}$ et l'OTF-2.

1.6.5 MÉTHODE DE DOSAGE UTILISÉE

Selon la littérature, l'activité de la glutathion réductase est de l'ordre du nmoles/minute/ 10^6 cellules (section 1.6.3 «ACTIVITÉ», page 63). Ce niveau d'activité nous a permis d'utiliser une variante du dosage du glutathion (FIGURE 3, page 25). L'ajout de GSSG, DTNB et NADPH à concentrations saturantes, a rendu l'activité de la GSSG-R limitante. Il suffisait de suivre dans le temps, la disparition du NADPH à 340 nm. C'est une méthode classique du dosage de l'activité de la GSSG-R (288). Les pièges à éviter, étaient le choix du tampon TRIS au lieu de phosphate (FIGURE 5, page 62) et ne pas laisser l'échantillon (la GSSG-R à évaluer) en contact avec le NADPH sans la présence de GSSG dans le milieu pour prévenir une inhibition possible. La technique du dosage est décrite sous la rubrique «*MATERIALS AND METHODS*» de la section 2.2.3, page 112. La réaction était linéaire entre 50 et 250×10^3 cellules ($r^2 > 0,98$, avec quatre expériences), et le seuil de détection était de 50 pmoles/minute, ce qui correspondait à environ 20×10^3 cellules.

1.7 CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DU NOUVEAU-NÉ

Lee Frank a démontré que la maturation de l'activité de divers enzymes impliquées dans la capacité antioxydante de l'organisme est parallèle au développement du surfactant dans le poumon de plusieurs espèces animales. En effet, dans les derniers 20 pourcent de la gestation, chez le rat, le lapin, le hamster ainsi que le cochon d'Indes, l'accroissement de l'activité de la SOD, de la catalase et de la GPx est similaire à l'augmentation de la quantité du surfactant pulmonaire (48, 49, 50). Lorsque ces animaux, nés prématurément, sont exposés à l'hyperoxie, leur décès survient dans les quelques jours. Cependant, à terme, dans les cas où une hyperoxie en période néonatale induit une augmentation de ces systèmes antioxydants, la période de survie est prolongée (289, 290). Ce qui n'est pas le cas chez l'animal adulte où l'hyperoxie n'induit pas d'augmentation de la capacité antioxydante et entraîne la mort (49). Par ces travaux, Lee Frank a démontré l'importance de la défense antioxydante pour la survie.

Par contre, l'animal qui a survécu à l'hyperoxie en induisant l'activité de sa catalase, SOD et GPx, développe une insuffisance respiratoire chronique. En effet, la période suivant la naissance est critique pour le développement alvéolaire. Le nombre d'alvéoles augmente et leur taille diminue d'autant. Ce qui a comme conséquence d'accroître considérablement la surface d'échange. Chez l'animal qui a survécu à l'hyperoxie, le nombre et la taille des alvéoles pulmonaires évoluent peu (49, 291, 292).

Il y a un intérêt particulier porté à l'enfant né prématurément.

Chez l'humain, le développement du poumon est rapide dans le dernier tiers de la gestation et se poursuit durant les huit premières années de sa vie. L'effet d'une charge oxydante sur le développement des alvéoles du poumon n'est pas, ou peu, connu chez l'humain. De même, il n'y a pas de relations de cause à effet bien établie entre oxydants et pathologies, ni même de francs marqueurs démontrant que l'enfant a subi une offense oxydante. Ce que l'on connaît est une relation indirecte avec la rétinopathie du prématuré (293, 294), l'entérocolite nécrosante (295, 296, 297), le syndrome de détresse respiratoire (10), et la dysplasie broncho-pulmonaire (293). La prévalence de celle-ci varie entre 10 et 50 % chez le prématuré selon son âge de gestation et son poids à la naissance (298). Chez les nouveau-nés en détresse respiratoire, une association a été démontrée entre la prématurité et une faible concentration sanguine (299) de glutathion réduit ainsi qu'entre l'hyperoxie et un bas contenu plasmatique de cystéine (299), élément essentiel à la synthèse de glutathion (106). De plus, la concentration de glutathion dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires est abaissée chez des enfants nouveau-nés qui ont développé une maladie pulmonaire chronique (300).

Chez le nouveau-né prématuré, la mortalité (301 à 304) et la morbidité (304, 305) reliées à un phénomène oxydant sont élevées et dépendantes du genre. En effet, les garçons sont plus à risque. Ceci suggère que pour un même âge de gestation, la capacité antioxydante diffère selon le sexe de l'enfant.

1.7.1 MATURATION DE LA DÉFENSE ANTIOXYDANTE

1.7.1.1 CHEZ L'HUMAIN

Somme toute, on ne connaît que peu de chose sur la maturation de la capacité antioxydante chez l'humain. Il est vrai que la difficulté d'obtenir du tissu humain est un obstacle dans l'acquisition des connaissances. Une recherche bibliographique sur «MedLine» entre 1966 et juillet 1997 avec les mots clés «*Antioxidant and infant, newborn, diseases*» et «*Antioxidant and infant, premature, diseases*» n'a répertorié respectivement que 5 et 10 articles. Aucun d'eux ne portait sur la maturation de la capacité antioxydante. Le peu de données disponibles chez l'humain ne permet pas de conclure sur la maturation de sa défense antioxydante. Malgré tout, il est possible de trouver quelques références sur la maturation de l'activité de la catalase, de la SOD et de la GPx. Les tissus humains étudiés sont surtout le sang, mais aussi, en de rares occasions, le poumon et le foie.

Une étude (306) rapporte une corrélation, $r^2=0,45$, entre l'âge de gestation (de 15 à 40 semaines) et l'activité de la catalase pulmonaire. L'activité a triplé durant cette période. Cependant, dans cette étude, la variation de l'activité chez l'adulte était telle, qu'aucune différence n'a pu être documentée entre la période foetale et adulte. D'autres ont rapporté que, dans le sang de cordons obtenus à terme, l'activité de cette enzyme n'est pas significativement différente de celle observée chez l'adulte (307). Au foie, l'activité de la catalase est constante entre la quinzième semaine de gestation et le terme (306).

Si certains (306) ne démontrent pas de relation entre l'âge de gestation et l'activité de la SOD et de la GPx, tant au poumon qu'au foie humain, d'autres rapportent une augmentation de l'activité pulmonaire de la SOD entre la période foetale (18-20 semaines), néonatale (de 18 heures à 2 mois) et la vie adulte (308). Dans les trois premiers jours de vie, l'activité plasmatique de la SOD double (309). Dans le globule rouge, l'activité de la SOD et celle de la GPx sont identiques entre la période 17-25 semaines de gestation et le terme, malgré un pic d'activité observé durant la période 26-35 semaines de gestation (308, 310). En bref, pour ces trois enzymes de la défense antioxydante, la récolte d'information est plutôt maigre et peu concluante.

Lorsque l'on aborde la question de la capacité antioxydante globale du nouveau-né, on ne peut négliger le glutathion. Certes, les autres systèmes antioxydants sont importants, et la connaissance de leur ontogénie est pertinente. Cependant, un défaut ou une immaturité du système glutathion compromet leur propre efficacité. Qu'en est-il donc de la maturation du système glutathion, c'est à dire de sa concentration tissulaire, de sa synthèse et de son recyclage?

Chez le foetus humain, autant dans le plasma (entre 23-33 et 34-42 semaines de gestation) (8), que dans le globule rouge (entre 33 et 41 semaines) (28), la concentration de GSH croît avec l'âge de gestation. Elle triple dans les cellules tandis qu'elle augmente de 1,5 fois dans le plasma. Dans le liquide tapissant les alvéoles pulmonaires, la concentration de glutathion est d'environ 5 μ M

(300) comparativement à 430 μ M chez l'adulte (311). À terme, le niveau de glutathion dans l'érythrocyte humain est plus élevé que dans celui de l'adulte (307). Les globules rouges d'enfants de 17 à 24 semaines de gestation contiennent aussi plus de glutathion que ceux de l'adulte (162).

La synthèse du glutathion (voir FIGURE 1 à la page 18) requière deux enzymes: la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCCase) et la glutathion synthétase (GSHase). Dans le foie humain obtenu entre la 10 et la 25 ième semaine de gestation, aucune corrélation entre l'activité de ces deux enzymes et l'âge de gestation n'a pu être démontrée (312). La même conclusion a été obtenue pour la γ -GCCase des érythrocytes humains provenant de fœtus de 17 à 24 semaines (162). De plus, Rollins (312) rapporte que l'activité de la GSHase dans ces tissus est comparable à celle mesurée dans des tissus adultes.

Pour que la synthèse ait lieu il faut que les acides aminés glycine, cystéine et acide glutamique soient disponibles. Comme mentionné plus loin (section 1.5 « γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE», page 52), la concentration cellulaire de cystéine est bien souvent une étape limitante de la synthèse du glutathion (106). En effet, la concentration intracellulaire de cystéine, 0,2-0,35 mM (147, 159), est généralement inférieure au K_m (0,35 mM) de la γ -glutamylcystéine synthétase (première enzyme de la synthèse de GSH). La γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) est une enzyme importante pour l'entrée de cystéine dans la cellule. À ma connaissance, il n'y a qu'une étude (312) ayant pour objet la

maturation de l'activité de cette enzyme chez l'humain. L'activité de la γ -GT d'un foie de 10 à 25 semaines de gestation est de 3 fois supérieure à celle retrouvée chez l'adulte (312).

Afin de maintenir le glutathion cellulaire dans son état actif, la glutathion réductase (GSSG-R) recycle le glutathion oxydé. La capacité de la cellule à maintenir son GSH est primordiale face à un stimulus oxydant (313). On ne connaît pas la maturation de l'activité de cette enzyme. Cependant, il est bien décrit que l'activité de la GSSG-R érythrocytaire est plus élevée chez le nouveau-né que chez l'adulte (252, 307, 314), et ce jusqu'à deux fois plus (241, 253). Toutefois, ces tissus n'ont pas la même teneur en cellules nucléées.

1.7.1.2 CHEZ L'ANIMAL

L'état de la maturation de ces enzymes (synthèse, γ -GT et recyclage) est un peu mieux décrit chez l'animal. Au niveau de la synthèse, seule la γ -GCase fut étudiée. Dans le rein et le foie de rat, l'activité augmente entre le stade foetal, la fin de la gestation et le stade adulte (155, 315). Tandis que chez la souris, l'activité au poumon ne montrait aucune relation avec l'âge post-natal (entre 1, 2, 3 et 8-10 semaines de vie) (163).

Cependant, il semble y avoir une maturation de l'activité de la GSSG-R durant la vie foetale et même postnatale. En effet, dans le cerveau du cochon d'Indes, entre le 30 ième et 45 ième jour de gestation (le terme étant à 65 jours) la GSSG-R a une activité

constante de 20 mU / mg protéines; du jour 45 jusqu'au jour 60 de la gestation, l'activité croît pour atteindre 35 mU / mg protéines (316). Durant la période foetale du rat, l'activité hépatique correspond à 65% de celle de l'adulte (264). À terme, elle est de 7 U / g de foie frais comparativement à 10 U / g de tissu frais chez l'adulte (99, 264, 266). La période néonatale présente une particularité importante. L'activité chute entre la naissance et les premiers jours de vie. Au niveau pulmonaire, l'activité passe de 16, à la naissance, à 10 mU / mg protéine à 3-14 jours de vies (317). De même, la chute est marquée entre la naissance et le premier jour de vie dans la mitochondrie (autant de foie, de coeur que de rein) chez le cochon d'Indes: 21 ± 4 vs 13 ± 2 mU / mg protéines (318). Chez cet animal, l'activité mesurée à un jour de vie est la même que chez l'adulte (318).

Durant le développement du rat, l'activité de la γ -GT hépatique varie de façon inverse à la maturation de l'animal. Elle augmente rapidement en fin de gestation (211) pour atteindre un maximum près de la naissance (211). En période néonatale, la chute d'activité est rapide (211, 319, 320); en quelques jours elle atteint le niveau mesuré chez l'animal adulte (211, 319, 320). Bref, au foie, l'activité de la γ -GT en fin de vie foetale est supérieure à celle retrouvée en période néonatale (moins de 10 jours) (211, 319) qui est elle-même plus élevée que celle mesurée chez l'adulte (130, 211, 319, 320, 321). Dans le foie de rat, le rapport est de «1,8 : 1 : 0,35 : 0,05» pour «17-18 jour de gestation : naissance: 4-5 jours de vie : adulte» (211, 319). Au contraire du foie, dans le poumon et le rein du rat, l'activité de la γ -GT croît

durant la gestation (211, 216) et l'augmentation se poursuit jusqu'au stade adulte (130, 211, 216).

1.8 OBJECTIFS

Dans le but d'améliorer la capacité antioxydante du prématuré, l'**objectif général de la thèse** est de connaître l'état de la maturation du système glutathion chez l'humain. En effet, les quelques données, tant animales qu'humaines, tirées de la littérature ne permettent pas de conclure sur cette maturation. Cependant, on peut en dégager les tendances suivantes. 1) Le ratio de la concentration de glutathion chez le prématuré sur celui de l'enfant né à terme est de 0,3 dans l'érythrocyte (28), 0,6 dans le plasma (8) et de 0,01 dans le liquide tapissant les alvéoles pulmonaires (300, 311). 2) Aucune maturation de l'activité de synthèse du glutathion n'a lieu, que ce soit en pré ou en postnatal. 3) La maturation de l'activité de la γ -GT est corrélée avec l'âge de gestation. Cependant, selon l'organe, cette corrélation peut être positive (poumon) ou négative (foie). 4) La GSSG-R semble présenter un pic d'activité correspondant à la naissance de l'animal à terme.

Objectifs spécifiques.

- 1) Vérifier si le genre influence la réponse à un stimulus oxydant.
- 2) Vérifier si le niveau abaissé de glutathion chez le prématuré est expliqué par l'immaturité des enzymes responsables du maintien de la concentration intracellulaire de glutathion.
- 3) Vérifier si les différences liées au genre sont expliquées par l'activité des enzymes responsables du maintien de la concentration intracellulaire de glutathion.

1.9 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Un des points pertinents des travaux de cette thèse est la provenance humaine des données. Le choix des tissus humains ainsi que leurs cueillettes, ont été autorisés par le comité d'éthique de l'hôpital Sainte-Justine.

La première partie des travaux a été possible grâce à l'utilisation de cellules endothéliales isolées ou gardées intactes dans la veine ombilicale. Dans la seconde phase de l'étude, des cellules provenant d'aspirats endotrachéaux ont été utilisées pour mieux quantifier l'effet de la maturation.

Pour le premier article (page 85), la veine ombilicale gardée intacte dans le cordon a servi de modèle expérimental. Ces cordons ombilicaux provenaient d'enfants nés à terme. Ce modèle a permis aussi une évaluation globale de la capacité du système glutathion à contrer les éléments oxydants perfusés. Puisque le métabolisme cellulaire normal du peroxyde est sa réduction en eau ou en alcool par la GPx, la quantité de glutathion dans l'éluat pouvait être un reflet de l'activité du système GPx - GSSG-R (voir FIGURE 2 à la page 22). La présence de glutathion dans l'éluat a été utilisé comme indice d'une perturbation du système glutathion. La production d'eicosanoïdes par la veine a été utilisée comme marqueur d'une possible offense par les peroxydes infusés. De plus, l'effet du genre pouvait facilement être évalué en discriminant les résultats selon la provenance du tissu.

Au deuxième article, la veine gardée intacte dans le cordon a d'abord été perfusée par une solution contenant ou non des peroxydes. Les cellules endothéliales ont aussi été isolées afin d'évaluer leur viabilité et leur activité en GSSG-R. Ce modèle a permis de vérifier l'hypothèse émise suite au premier article, soit une différence liée au genre dans l'induction de l'activité de la GSSG-R par un oxydant. L'effet sexe sur l'induction d'activité de la réductase, a également été recherché dans des cellules endothéliales en culture de 20 heures. Ces cellules ont d'abord été isolées puis laissées 20 heures en culture avant l'ajout de peroxydes.

L'utilisation d'une deuxième source de cellules humaines, des cellules isolées d'aspirats endotrachéaux de nouveau-nés, ont permis de vérifier la spécificité tissulaire de l'induction de la GSSG-R et de quantifier l'effet de l'âge de gestation, de l'âge postnatal et du genre sur le système glutathion. Ce tissu était facilement disponible puisque l'infirmière aspire de routine toutes les 3 à 4 heures les liquides endotrachéaux chez les enfants intubés. La concentration cellulaire de glutathion et l'activité de la GSSG-R font l'objet du deuxième article (page 108), tandis que la maturation des activités de synthèse et de γ -GT représente le sujet du troisième article (page 143).

Les cellules d'aspirats endotrachéaux, surtout des leucocytes, provenaient d'un milieu oxydant. En effet, tous les enfants avaient reçu à un moment ou un autre une fraction inspiratoire en oxygène (F_{iO_2}) de plus de 30%. Ceci rendait ces cellules

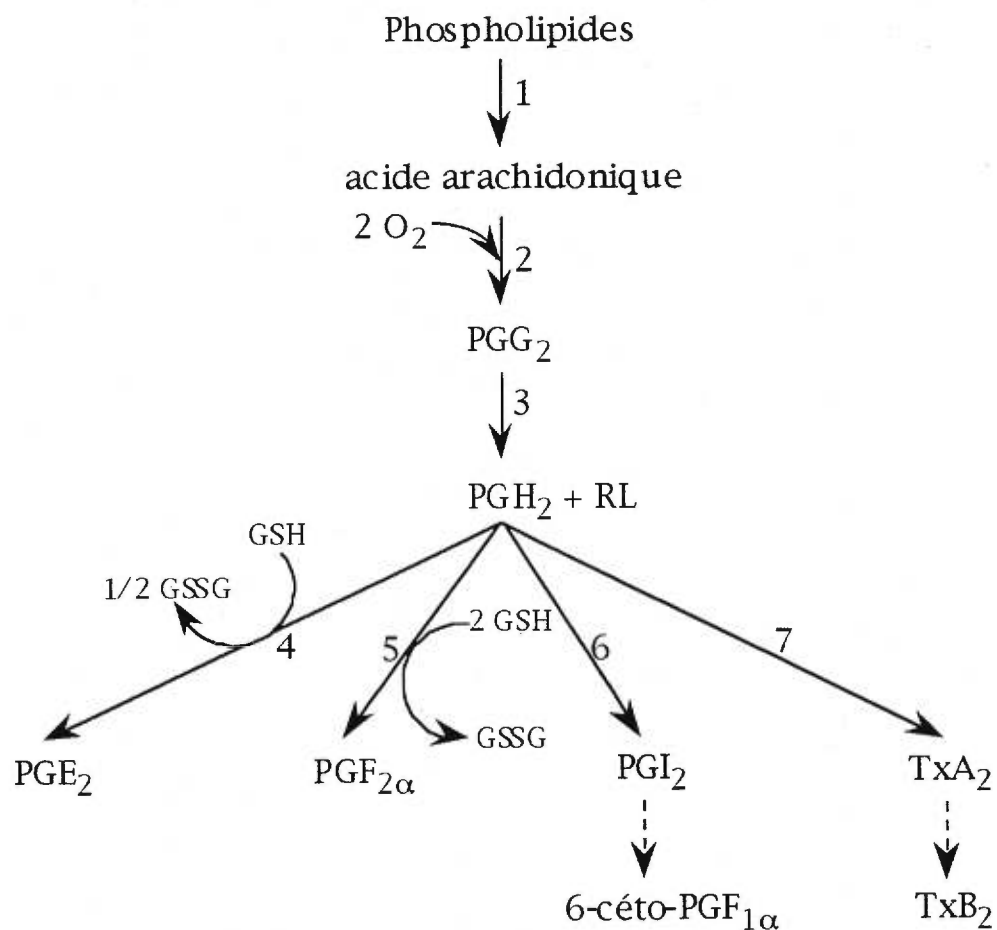
d'autant plus intéressantes que les résultats sur les cellules endothéliales suggéraient un métabolisme du glutathion différent selon l'intensité du stimulus oxydant. Enfin, des leucocytes isolés de sang de cordons ombilicaux ont été utilisés comme cellules provenant d'un milieu non oxydant.

1.10 EICOSANOÏDES

Puisque le sujet de la thèse est le glutathion et que la production veineuse de prostaglandines était celui du mémoire de maîtrise, je ne présente pas de revue de littérature sur le métabolisme des eicosanoïdes. Cependant, pour aider à la compréhension du premier article, un sommaire de la synthèse des eicosanoïdes est présenté dans cette section de la thèse (FIGURE 6, page suivante).

La relâche de l'acide arachidonique par la phospholipase A₂ est une étape limitante dans la production d'eicosanoïdes (322). La cyclooxygénase (COX) transforme en deux étapes (323, 324) cet acide gras en PGH₂. Dans un premier temps, elle agit comme une oxygénase en ajoutant deux molécules d'O₂ pour former la PGG₂. Celle-ci a une fonction endoperoxyde entre les carbones 9 et 11, et hydroperoxyde à la position 15. La propriété peroxydasique de la COX réduit cet hydroperoxyde en PGH₂ et libère un radical libre (RL) (324, 325, 326). Ce dernier joue un rôle important dans la régulation de la production de différentes prostaglandines. Nous y reviendrons un peu plus loin. La PGH₂ est le précurseur des autres eicosanoïdes de la série 2. Elle est le substrat de la PGF_{2α} réductase et de la PGE₂ isomérase. La formation de PGF_{2α} requiert deux molécules de GSH comme cofacteurs, tandis que la synthèse de PGE₂ n'en requiert qu'une (88). La prostacycline synthétase transforme la PGH₂ en PGI₂, et la thromboxane synthétase l'utilise pour former la TxA₂. Puisque TxA₂ et PGI₂ sont transformés rapidement en leur métabolites stables TxB₂ et 6-céto-PGF_{1α}, ces deux dernières sont mesurées au lieu de TxA₂ et PGI₂.

Figure 6. SYNTHÈSE D'EICOSANOIDES



1 : phospholipase A₂
 2 : PGH₂ synthétase
 3 : PGG₂ synthétase
 2 + 3 : cyclooxygénase

4 : PGE₂ isomérase
 5 : PGF_{2α} réductase
 6 : PGI₂ synthétase
 7 : TxA₂ synthétase

voie enzymatique :

voie non enzymatique :

Une caractéristique particulière de la production des eicosanoïdes est la formation d'un radical libre en même temps que la PGH_2 . À faible concentration les RL activent la COX, générant ainsi de plus en plus de RL; et à haute concentration, ils inhibent l'activité enzymatique (325, 327, 328, 329). Donc, dans un premier temps, l'activité enzymatique s'accroît rapidement pour, par la suite, diminuer graduellement. Afin de maintenir la production d'eicosanoïdes une nouvelle synthèse de cyclooxygénase est nécessaire.

CHAPITRE 2. PUBLICATIONS

Trois articles forment les trois sections de ce chapitre. Les deux premiers sont publiés, et le dernier est sous presse (voir à la page 144). Ci-dessous, se trouve la référence complète de ces articles.

- 2.1 Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxyde-induced oxidation in human neonatal tissue*. Free Radical Biol Med 1994; 16:307-13.
- 2.2 Lavoie JC, Chessex P. *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues*. Free Radical Biol Med 1997; 23:648-57.
- 2.3 Lavoie JC, Chessex P. *Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants* . Free Radical Biol Med 1998; sous presse.

2.1 GENDER-RELATED RESPONSE TO A TERT-BUTYLHYDROPEROXYDE-INDUCED OXYDATION IN HUMAN NEONATAL TISSUE

Jean-Claude Lavoie, M.Sc. and Philippe Chessex, M.D.

Perinatal Service and Research Center, Hôpital Ste-Justine,
Department of Pediatrics, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Address for mailing correspondence and reprints request:

Philippe Chessex, M.D.

Research Center

Hôpital Sainte-Justine

3175 Chemin Côte Sainte-Catherine

Montreal (Quebec) Canada

H3T 1C5

Telephone: (514) 345-4730

Telefax: (514) 345-4801

Running title: Gender and eicosanoids

2.1.1 ABSTRACT

Gender-related response to an intracellular oxidant in human neonatal tissue

Reports of gender-related differences in the activity of enzymes involved in the metabolism of intracellular antioxidants, led us to verify if the prostaglandin response to TBH differed according to the sex of infants. Segments of human umbilical veins were perfused in the presence or absence of TBH (0.25 mmol/L, and 1.0 mmol/L). Since TBH is quenched in the cell by glutathione peroxidase, total glutathione concentrations and the production of glutathione-dependent prostaglandins (PGE₂ & PGF_{2α}) as well as membrane-derived eicosanoids (PGI₂ & thromboxane) were measured in the eluate. In veins from boys, TBH induced a sustained response for glutathione only, which was increased (p<0.05). In female-derived tissue, the hydroperoxide induced a different response according to the dose of TBH. At 0.25 mmol/L, a drop (p<0.005) in PGF_{2α} was associated to a rise (p<0.001) in thromboxane. At 1.0 mmol/L, TBH had an opposite effect, there was a rise (p<0.01) in PGE₂ and PGI₂. The prostaglandin concentrations were not proportional to the oxidative stimulus, suggesting a critical level of TBH at which the oxidative state differs in tissues derived from boys or girls.

Key words: gender; glutathione; prostaglandins; reactive oxygen species; tert-butyl hydroperoxide.

2.1.2 INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are known to interfere with the production of eicosanoids (1-4). Initially, the synthesis of PG's requires an activation of cyclooxygenase by ROS (5). The further synthesis of PG's generates endogenous ROS which contribute to accelerate the reaction, up to a critical concentration above which cyclooxygenase is inhibited (3-4). This reaction generates PGH_2 , the substrate for membrane as well as intracellular production of vasoactive prostanoids.

We previously documented, in a vascular model, that the infusion of a hydroxyl radical generating system inhibited prostacyclin (PGI_2) synthesis, but did not affect intracellular production of PGE_2 (6). In order to verify if this response is membrane-dependent, we engaged to study the effect of another oxidant, the tert-butylhydroperoxide (TBH), which is known to act primarily at the intracellular level (7-9). Hydroperoxides contribute to various pathophysiological cell (10) and tissue alterations (11). Under normal conditions, the cytotoxic effects of hydroperoxides would be countered by cytoplasmic antioxidant systems such as glutathione (7,8,12). Only when the capacity of the cell to reduce TBH by glutathione peroxidase is exceeded, will this hydroperoxide act at the membrane level (13). Since glutathione is an intracellular cofactor of PGE_2 isomerase and $\text{PGF}_{2\alpha}$ reductase (14), we hypothesized that the perfusion of our vascular model with TBH in the range of intracellular glutathione (8) would interfere with the production of these cytoplasmic eicosanoids.

Therefore, it was anticipated that TBH would produce a decrease in these glutathione-dependent prostaglandins thereby increasing the availability of PGH₂, which in turn would lead to an increase in membrane-derived prostaglandins (PGI₂ and thromboxane).

In hepatic tissue of young animals the activities of γ -glutamyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase were found to be respectively, 40% and 75% lower in male compared to female rats (15); these enzymes contribute to maintain intracellular reduced glutathione content. The clinical importance of identifying those factors controlling the maturation of antioxidant systems in newborn infants (16) coupled with animal studies suggesting a gender-dependent maturation of antioxidant systems (15,17), led us to verify if changes in eicosanoids in response to tert-butyl hydroperoxide in a human neonatal tissue differed between infants of both sexes.

2.1.3 MATERIALS AND METHODS

The vascular model used in the present experiments was previously validated using comparable procedures (6). Briefly, the vein of a 10 cm section of undamaged umbilical cord, obtained from term repeat Cesarean sections following normal pregnancies, was perfused with an oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) solution using a peristaltic pump.

The control perfused solution (pH 7.4) had a fixed proportion (A:B:C=0.5:0.14:0.36) of: (A) nutritive medium M199 (Flow

Laboratories Inc., Mississauga, Ont) containing 50 mmol/L NaHCO₃; (B) Travasol 10% Blend C amino acid solution in Viaflex (Clintec Nutrition, Mississauga, Ontario, Canada); (C) water. Electrolytes were added at the following final concentrations (mmol/L): Na = 238, K= 8.4, Cl= 234, Ca= 3.9, Mg = 1.0, SO₄ = 1.0, acetate = 12.7.

The tested perfused solutions were made of the control to which tert-butyl hydroperoxide was added at final concentrations of 0.25 mmol/L and 1.0 mmol/L. These concentrations were chosen because they are in the range of intracellular glutathione (8).

The experimental protocols consisted of two series of measurements designed to study the effects of gender and of TBH on prostaglandins and glutathione concentrations in the eluate. First, in order to establish if there were differences related to gender, measurements performed in a non stimulated state were compared between the umbilical veins from boys (n=8) and from girls (n=8) receiving the control solution. Secondly, to study the effects of the hydroperoxide, TBH infused veins were compared to further controls in a paired fashion (n=16). The experiments were performed at 2 concentrations of TBH: 0.25 mmol/L (n=8) and 1.0 mmol/L (n=8). At each concentration, four umbilical veins were obtained from male infants and four from female infants. The control and tested solutions were randomly assigned to 2 adjacent venous segments from the same umbilical cord.

Within 0.5 h of birth, the vein was perfused during 15 minutes

with a flow rate set at 200 mL/h to wash out residual blood. Thereafter, the flow was maintained at a constant rate of 20 mL/h (6). Each aliquot of eluate (0.9 mL) was sampled at the distal end of the vein at 0.5, 1.5, 2.5 and 3.5 h of perfusion mixed with 0.1 mL indomethacin (200 $\mu\text{mol/L}$ in M199) and immediately stored at -70°C until eicosanoids and glutathione determinations. Furthermore, an aliquot of each studied solution was treated in the same fashion to constitute the blank, which was subtracted from the measured value of each sample.

Analytical procedures: PGE_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (the stable metabolite of PGI $_2$), TxB $_2$ (the stable metabolite of TxA $_2$) and PGF $_{2\alpha}$ were measured directly on the sample by radioimmunoassay using the antisera from Advanced Magnetics Inc. (Cambridge, Mass, USA). Briefly, after 2 hours of incubation at 25°C with the antisera, the free ^3H -tracer was separated by charcoal-dextran precipitation. An aliquot of the supernatant, reflecting the bound fraction, was counted. We previously verified that the assay measured only prostaglandins (6). Samples were measured before and after extraction on reverse phase Sep-Pack column; for all four eicosanoids there was over 90% recovery. The cross reactivities at half of Bo/T within the measured eicosanoids were below 2.5%. The levels of detection within a 95% confidence limit were 0.08 $\mu\text{g/L}$ for 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, 0.12 $\mu\text{g/L}$ for PGE_2 , 0.03 $\mu\text{g/L}$ for PGF $_{2\alpha}$ and 0.04 $\mu\text{g/L}$ for TxB $_2$.

Total glutathione was measured directly in the perfusate according to the method of Griffith (18). Total glutathione

concentration was assayed using glutathione, glutathione reductase and NADPH (Boehring-Mannheim, Laval, Qué, Canada) as well as 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA). The level of detection within a 95% confidence limit was 34 nmol/L. Using this assay we measured total glutathione in cord blood (mean \pm SEM, 0.64 \pm 0.04 mmol/L, n=8) in the same range as values obtained in other biological tissues (8).

Statistical analysis: The effects of gender, time and treatments were separated by a multi-factorial paired ANOVA. Since the concentrations of total glutathione measured at 2.5 and 3.5 h were undetectable, the ANOVA was performed only with the first two time points (0.5 and 1.5 h). All comparisons were performed orthogonally. The data are presented as mean \pm SEM. The level of significance was set at $p < 0.05$.

2.1.4 RESULTS

The umbilical vein productions of PGE₂, PGI₂, PGF_{2 α} , TxA₂ and total glutathione are shown separately for boys and girls in **Figure 1**. Total glutathione levels were detectable only at 0.5 and 1.5 h. There was a significant ($p < 0.01$) decrease in PGI₂, PGF_{2 α} and glutathione over time. However, in the basal state there was no difference between boys and girls for concentrations of PGE₂, PGI₂, PGF_{2 α} , TxA₂ and total glutathione (**Table I**).

In the second series of experiments testing the effect of TBH,

controls were comparable to values shown in Figure 1, therefore they are not presented. The effects of an oxidative challenge with 2 concentrations of tert-butylhydroperoxide (0.25 and 1.0 mmol/L) were expressed as a percentage of the control perfusion, in order to control for the effect of time, a variable inherent to the model (6,19-20). The statistical analysis (Table 2) demonstrated a significant interaction ($p < 0.01$) between treatment and gender, enabling us to analyse separately the results in veins obtained from boys and girls. The results for boys are shown in Figure 2 and for girls in Figure 3.

The stable metabolite of PGI_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, showed a separate response to TBH between male and female-derived vessels; in the umbilical veins obtained from girls, we observed an increase ($p < 0.01$) in PGI_2 at the higher concentration of TBH (Figure 3). Similarly, the glutathione-dependent prostaglandin PGE_2 was stimulated ($p < 0.01$) at 1.0 mmol/L TBH (Figure 3), only in the female-derived tissue.

Another glutathione-dependent prostaglandin, $\text{PGF}_{2\alpha}$, also showed gender-dependent responses to TBH; in the umbilical vessels obtained from girls (Figure 3) we found an inhibition of $\text{PGF}_{2\alpha}$ at 0.25 mmol/L TBH ($p < 0.005$), as opposed to boys in whom the inhibition ($p < 0.005$) was noted only at the higher concentration of hydroperoxide (Figure 2).

A sustained stimulation of thromboxane ($p < 0.001$) was found only in female-derived tissue, but this stimulation was significantly ($p < 0.001$) greater at the lower TBH concentration (Figure 3). In

the umbilical veins obtained from boys, the results for thromboxane were analyzed for each time separately because of a time-treatment interaction; thromboxane was increased significantly only at 0.5 h (Figure 2).

Total glutathione concentrations, detectable only at 0.5 and 1.5 h, did not differ from the control in female derived-tissue (Figure 3), whereas in the male counterpart (Figure 2) total glutathione increased significantly ($p < 0.05$) after TBH (Table 2).

2.1.5 DISCUSSION

The major finding of this study relates to the observation that the response to the oxidation induced by TBH was gender-dependent. The eicosanoid and glutathione outputs were not proportional to the oxidative stimulus.

At the lower TBH concentration, there was no sustained prostaglandin response in the umbilical veins obtained from boys. However, in the tissue from girls, a drop in $\text{PGF}_{2\alpha}$ coupled to a rise in thromboxane points towards an effect of TBH beyond PGH_2 . The higher concentration of the membrane-derived thromboxane could be explained by the greater availability of PGH_2 following the drop in cytoplasmic-derived $\text{PGF}_{2\alpha}$. Because glutathione is a cofactor of the synthesis of several PGs (14), the drop in $\text{PGF}_{2\alpha}$ suggests a lower concentration of glutathione following the reduction of TBH. But, similar responses would be expected from PGE_2 . This discrepancy could be explained by the fact that PGE_2

synthesis could be less sensitive to the effect of TBH since this cytoplasmic PG requires half the amount of glutathione for its synthesis compared to $\text{PGF}_{2\alpha}$. On the other hand, it appears from figure 3 that the 30% drop in $\text{PGF}_{2\alpha}$ would be too small to enable the detection of a significant change in PGI_2 , since this last PG has a 10 fold greater concentration. Furthermore, the observed difference in response between thromboxane and PGI_2 is supported by a study documenting, in microsomes, that oxidants produced *in situ* have an inhibitory effect on prostacyclin synthetase but not on thromboxane synthetase (21).

At the higher TBH concentration, the tissue derived from girls presented an overall different pattern of eicosanoid response compared to the one observed at 0.25 mmol/L TBH. Following the previous remark on the sensitivity of prostacyclin synthetase (21), the gender-dependent increase in PGI_2 concentration (Figure 3) suggests a stimulation of the antioxidant activity of the tissue derived from girls. Indeed, if the capacity of the cell to reduce TBH had been exceeded, the hydroperoxide would act on the cell membrane (13) resulting in an inhibition of PGI_2 synthetase (22,23). A greater availability of reduced glutathione would contribute to interrupt the negative feedback on cyclooxygenase and PGI_2 synthetase by the endogenous ROS produced during prostaglandin synthesis (21,24,25) leading to an increased production of PGH_2 and PGI_2 (21), respectively. In addition to a greater availability of PGH_2 , an increase in the cofactor glutathione required for PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis (14), could account for the enhanced PGE_2 synthesis (Figure 3) and for

the fact that the drop in $\text{PGF}_{2\alpha}$ observed at 0.25 mmol/L has disappeared at 1.0 mmol/L TBH. The statistically significant but noticeably smaller increase in thromboxane compared to PGI_2 (Figure 3 and Table 2), is in keeping with the imbalance in activities of prostacyclin synthetase and thromboxane synthetase (21,22), in spite of their very similar configurations (26). The fact that the prostaglandin concentrations were not proportional to the oxidative stimulus, suggests that there was a critical level of TBH affecting the cellular oxidative state differently in tissues derived from boys or girls.

Because of the link between PG synthesis and glutathione (14), we speculate that the gender-related production of eicosanoids induced by the higher TBH concentration is due to a stimulation of the reduction of glutathione in female-derived vessels. This speculation is supported by animal studies showing a female specific increase in the activities of glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and/or γ -glutamyl transferase (15). This is in agreement with the limited change in extracellular glutathione observed in the eluate from female vessels (Figure 3). Although that response differs from male derived tissue, the experimental model did not allow for any confirmation of this hypothesis by measurements of intracellular glutathione concentrations in female-derived tissue. It is important to note that the levels measured in the eluate were several-fold lower than the concentrations reported in biological tissues (8), therefore it would appear difficult to extrapolate from these results any intracellular glutathione depletion of

pathological significance. However, others found in a variety of tissues that the intracellular content (27,28) of glutathione or its turnover (29) rose after oxidative challenge.

The absence of differences in the basal state (Figure 1), underlines the fact that the observed gender-dependent responses to the oxidative stimulus could be due to differences in the maturation of antioxidant activities. This is supported by the animal studies (15) showing that the gender-related differences in activities of the enzymes involved in the reduction of glutathione, were limited to the younger rats. In contrast to the present study performed on human tissue, those experiments reporting gender differences in relation to glutathione turnover (15) and prostaglandin synthesis (30) were done in rats. A relation with sex hormones was observed without further explanations (30). Studies are needed to correlate prostaglandin synthesis with intracellular antioxidant activities. This subject is highly relevant because of the gender-related outcome of newborn infants with bronchopulmonary dysplasia (31), a neonatal chronic lung disease partially related to the maturation of antioxidant capacities (16). Male premature infants could be at greater risk of developing bronchopulmonary dysplasia because they are more susceptible to oxidant lung injury, or as a result of their more severe initial respiratory distress syndrome at birth, compared to girls of equivalent gestational age.

2.1.6 TABLES AND FIGURES

Table 1: Summary of statistical analysis for data of Figure 1

Variables	Degrees of freedom for PGs	Degrees of freedom for glutathione	F values for PGE ₂	F values for 6-keto-PGF _{1α}	F values for PGF _{2α}	F values for TxB ₂	F values for total glutathione
Between							
-subject	15,48	15,16	10.17**	0.61	2.05**	4.17**	0.70
Sex	1,14	1,14	2.28	0.17	0.45	0.05	0.04
Time	3,42	1,14	0.52	33.02**	14.63**	1.23	13.84**
Interaction							
Sex-time	3,42	1,14	1.03	0.24	0.38	0.59	1.13

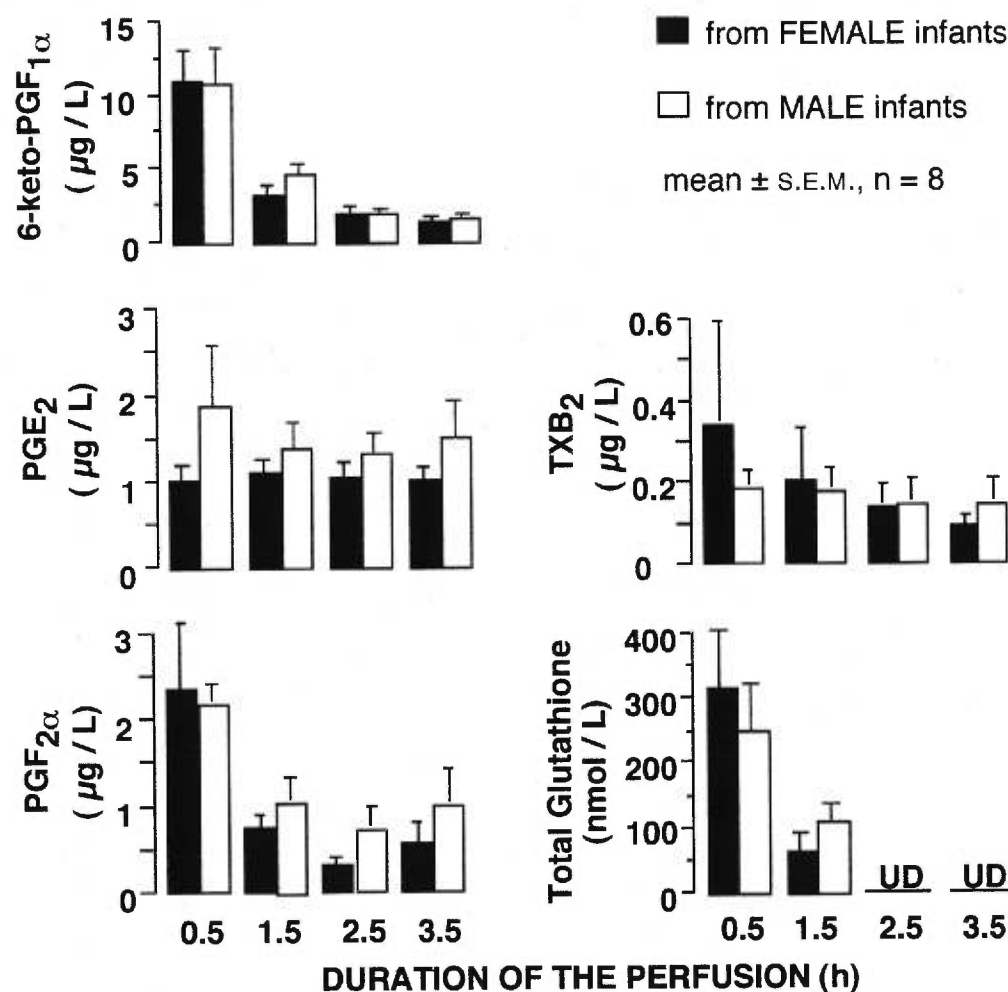
** p<0.01

Table 2: Summary of statistical analysis for data of Figures 2 and 3

Variables	Degrees of freedom for PGs	Degrees of freedom for glutathion	F values for PGE2	F values for 6-keto-PGF _{1α}	F values for PGF _{2α}	F values for TxB ₂	F values for total glutathione
Between-subject	15,112	15,48	6.79**	1.16	1.20	7.67**	2.05*
Sex	1,14	1,14	0.12	0.01	1.42	0.97	5.14*
Treatment	3,82	3,34	27.91**	13.76**	6.33**	36.55**	16.90**
Time	3,82	1,34	6.99**	250.5**	64.64**	12.36**	549.1**
Interaction							
Sex-treatment	3,82	3,34	48.11**	16.59**	2.81*	3.84**	81.74**
Male-TBH							
a) 0 vs 0.25 mmol/L	1,82	1,34	0.02	0.03	0.93	7.29**	122.32**
b) 0 vs 1.0 mmol/L	1,82	1,34	0.94	0.54	10.23**	4.00*	4.27*
a vs b	1,82	1,34	3.40	1.77	3.55	2.90	109.0**
Female-TBH							
a) 0 vs 0.25 mmol/L	1,82	1,34	2.24	1.28	11.34**	37.17**	0.24
b) 0 vs 1.0 mmol/L	1,82	1,34	98.69**	43.20**	0.01	5.12*	0.76
a vs b	1,82	1,34	122.8**	44.3**	1.37	99.96**	66.72**

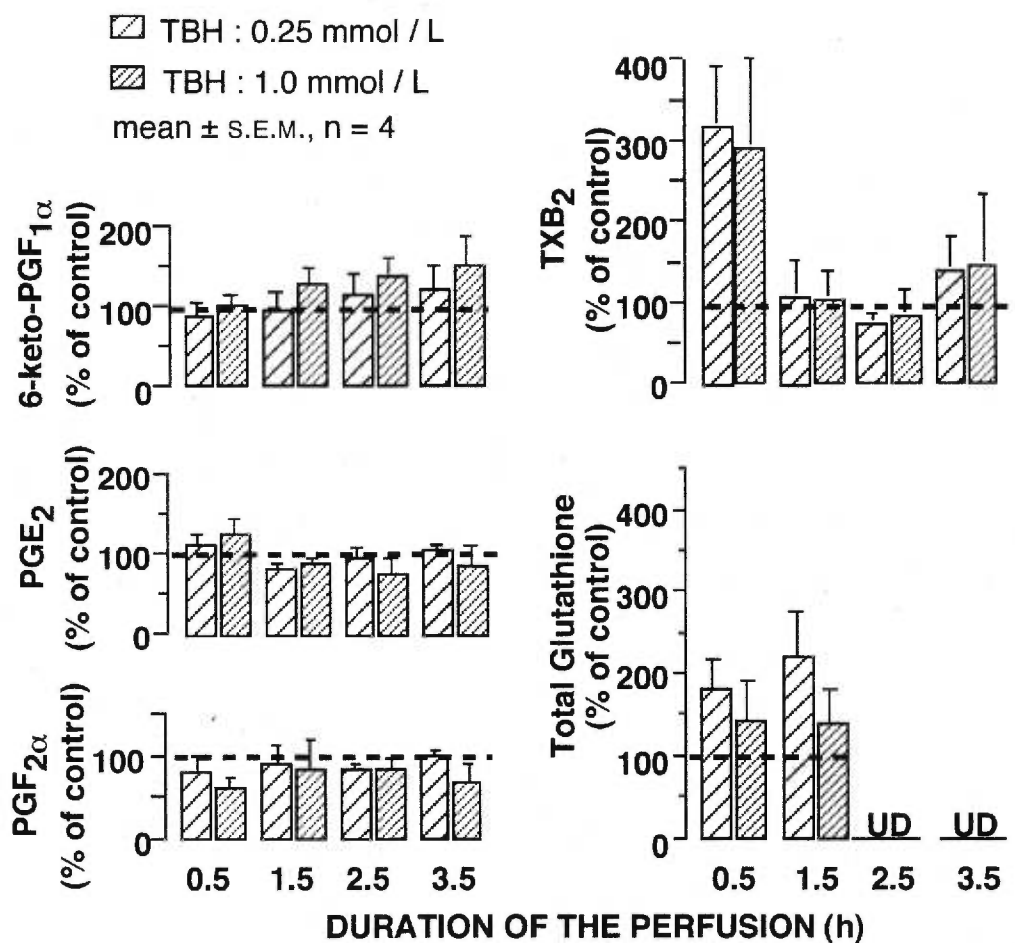
Treatment = effect of TBH; * p<0.05; ** p<0.01

Figure 1 : Comparisons between boys and girls of basal values of eicosanoids (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TxB₂) and total glutathione obtained in a non-stimulated state in the eluate of perfused veins.



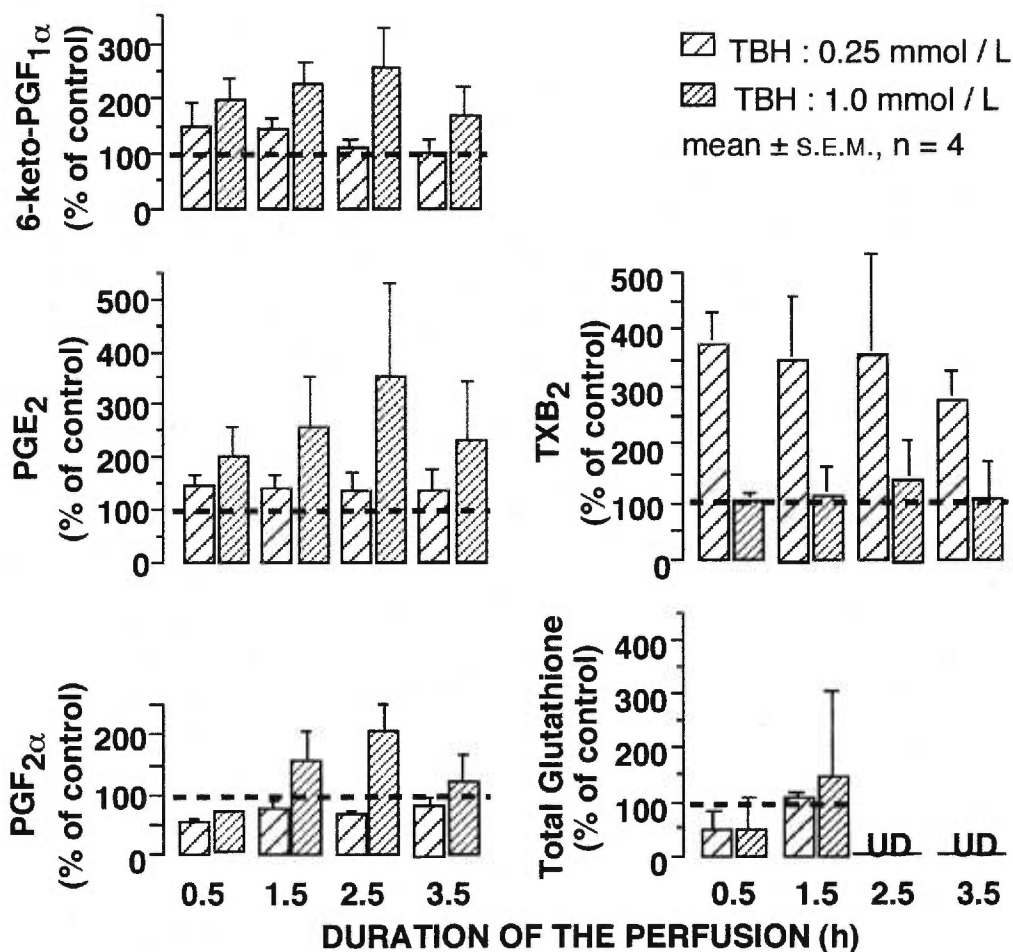
No gender-dependent differences were found. Overall, there was a significant ($p < 0.01$) effect of time on PGI₂, PGF_{2α} and total glutathione (detectable only at 0.5 and 1.5 h). UD stands for undetectable.

Figure 2 : Effects of TBH (0.25 and 1.0 mmol/L) on the relative concentrations (% of control) of eicosanoids (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TxB₂) and total glutathione in the eluate of perfused veins obtained from boys.



A significant decrease in PGF_{2α} was observed at 1.0 mmol/L TBH. Glutathione (detectable only at 0.5 and 1.5 h) increased significantly at the lower ($p < 0.001$) and higher ($p < 0.05$) concentrations of hydroperoxide. Because of a time-treatment interaction, the results for thromboxane were analyzed for each time separately; thromboxane increased ($p < 0.05$) only at 0.5 hour. UD stands for undetectable.

Figure 3 : Effects of TBH (0.25 and 1.0 mmol/L) on the relative concentrations (% of control) of eicosanoids (PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TxB₂) and total glutathione in the eluate of perfused veins obtained from girls.



At 0.25 mmol/L TBH there was a decrease ($p < 0.005$) in PGF_{2α} and a concomitant increase ($p < 0.001$) in TxB₂. At the higher concentration of hydroperoxide there was a significant increase in 6-keto-PGF_{1α} ($p < 0.001$), PGE₂ ($p < 0.001$) and TxB₂ ($p < 0.05$). UD stands for undetectable.

2.1.7 LIST OF ABBREVIATIONS

PG:	prostaglandin
PGE ₂ :	prostaglandin E ₂
PGF _{2α} :	prostaglandin F _{2α}
PGH ₂ :	prostaglandin H ₂
PGI ₂ :	prostaglandin I ₂
6-keto-PGF _{1α} :	6-keto-prostaglandin F _{1α} , stable metabolite of PGI ₂
ROS:	reactive oxygen species
TBH:	tert-butylhydroperoxide
TxA ₂ :	thromboxane A ₂
TxB ₂ :	thromboxane B ₂ , stable metabolite of TxA ₂

2.1.8 REFERENCES

1. Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE. *Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs.* J Clin Invest 1984; 74:608-13.
2. Markey CM, Alward A, Weller PE, Marnett LJ. *Quantitative studies of hydroperoxide reduction by prostglandin H synthase.* J Biol Chem 1987; 262:6266-79.
3. Egan RW, Gale PH, Kuehl FAJr. *Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase.* J Biol Chem 1979; 254:3295-302.
4. Chen SH, Wu HL, Lin MT, Jen CJ, Wing LYC, Lei HY, Tsao CJ, Chang WC. *Cytoprotective effect of reduced glutathione in hydrogen peroxide-induced endothelial cell injury.* Prost Leuk Essen Fatty Acids 1992; 45:299-305.
5. Eling E, Thompson DC, Foureman GL, Curtis JF, Hughes MF. *Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990; 30:1-45.
6. Lavoie JC, Chesse P. *Biological effects of parenteral bisulfite on human vascular tissue.* Pediatr Res 1993; 33:347-51.
7. Ochi T. *Effects of an organic hydroperoxide on the activity of antioxidant enzymes in cultured mammalian cells.* Toxicology 1990; 61:229-39.

- 8 DeLeve LD, Kaplowitz N. *Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity*. *Pharmac Ther* 1991; 52:287-305.
9. Black SM, Wolf CR. *The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance*. *Pharmac Ther* 1991; 51:139-54.
10. Schlegel J, Schweizer M, Richter C. *'Pore' formation is not required for the hydroperoxide-induced Ca²⁺ release from rat liver mitochondria*. *Biochem J* 1992; 285:65-9.
11. Glascott PAJr, Gilfor E, Farber JL. *Effects of vitamin E on the killing of cultured heptocytes by tert-butyl hydroperoxide*. *Mol Pharmacol* 1992; 41:1155-62.
12. Pigeolet E, Remacle J. *Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals*. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:191-5.
13. Schilling WP, Elliott SJ. *Ca²⁺ signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction*. *Am J Physiol* 1992; 262:H1617-30.
14. Ujihara M, Tsuchida S, Satoh K, Sato K, Urade Y. *Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin D₂, E₂ and F_{2α} formation from prostaglandin H₂ by various glutathione S-transferase isoenzymes*. *Arch Biochem Biophys* 1988; 264:428-37.

15. Rikans LE, Moore DR. *Influence of aging on rat liver enzymes involved in glutathione synthesis and degradation.* Arch Gerontol Geriatr 1991; 13:263-70.
16. Frank L. *Antioxidants, nutrition, and bronchopulmonary dysplasia.* In: Holtzman RB, Frank L eds. *Clinics in Perinatology. Bronchopulmonary Dysplasia.* Philadelphia: W.B. Saunders Co., Harcourt Brace Jovanovich 1992; 19:541-62.
17. Staffas L, Mankowitz L, Söderström M, Blanck A, Porsch-Hällström I, Sundberg C, Mannervik B, Olin B, Rydström J, DePierre JW. *Further characterization of hormonal regulation of glutathione transferase in rat liver and adrenal glands.* Biochem J 1992; 286:65-72.
18. Griffith OW. *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.* Anal Biochem 1980; 106:207-12.
19. Kent RS, Diedrich SL, Whorton AR. *Regulation of vascular prostaglandin synthesis by metabolites of arachidonic acid in perfused rabbit aorta.* J Clin Invest 1983; 72:455-65.
20. Quadt JFA, Voss R, ten Hoor F. *Prostacyclin production of the isolated pulsatingly perfused rat aorta.* J Pharmacol Methods 1982; 7:263-70.

21. Ham EA, Egan RW, Soderman DD, Gale PH, Kuehl FA. *Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase*. J Biol Chem 1979; 254:2191-4.
22. Bunting S, Moncada S, Vane JR. *The prostacyclin-thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications*. Br Med Bull 1983; 39:271-6.
23. Salmon JA, Smith DR, Flower RJ, Moncada S, Vane JR. *Further studies on the enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxides into prostacyclin by porcine aorta microsomes*. Biochem Biophys Acta 1978; 523:250-62.
24. Vapaatalo H. *Free radicals and anti-inflammatory drugs*. Med Biol 1986; 64:1-7.
25. Wu KKY. *Regulation of eicosanoid biosynthesis in endothelial cells: critical role of de novo synthesis of prostaglandin endoperoxide synthase*. In: Lieu CY, Chien S eds. *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis*. New York, Plenum Press, 1991; 297-301.
26. Hecker M, Ulrich V. *On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis*. J Biol Chem 1989; 264:141-50.
27. Allen RG. *Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: The metabolic paradox of cellular differentiation*. Proc Soc Exp Biol Med 1991; 196:117-29.

28. Utley WS, Mehendale HM. *Evidence for stimulated glutathione synthesis by phenobarbital pretreatment during an oxidative challenge in isolated hepatocytes.* J Biochem Toxicol 1991; 6:101-13.
29. Jongkind JF, Verkerk A, Baggen RGA. *Glutathione metabolism of human vascular endothelial cells under peroxidative stress.* Free Radical Biol Med 1989; 7:507-12.
30. Wakasugi M, Noguichi T, Kazama YI, Kanemaru Y, Onaya T. *The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues.* Prostaglandins 1989; 37:401-10.
31. Pearson E, Bose C, Snidow T, Ransom L, Young T, Bose G, Stiles A. *Trial of vitamin A supplementation in very low birth weight infants at risk for bronchopulmonary dysplasia.* J Pediatr 1992; 121:420-7.

2.2 GENDER AND MATURATION AFFECT GLUTATHIONE STATUS
IN HUMAN NEONATAL TISSUES

Jean-Claude Lavoie, M.Sc. ; Philippe Chessex, M.D.

Perinatal Service and Research Center, Hôpital Ste-Justine,
Department of Pediatrics, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Address for mailing correspondence and reprints request:

Philippe Chessex, M.D.

Research Center

Hôpital Ste-Justine

3175 Chemin Côte Ste-Catherine

Montreal, Quebec, Canada

H3T 1C5

Telephone : (514) 345-4730

Fax : (514) 345-4801

Running title : Gender, maturation and GSH

2.2.1 ABSTRACT

Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues.

The objective was to verify if human tissues derived from baby girls had a greater ability than tissues derived from males to stimulate the glutathione-reductase, when faced with an oxidative challenge. *In vitro*, the effect of a calibrated oxidative challenge was studied in endothelial cells. *In vivo*, the effect of a clinically relevant oxidative challenge was studied in cells from tracheal aspirates derived from oxygen-dependent newborn infants. In endothelial cells, the oxidant tert-butylhydroperoxide had a stimulating effect on GSSG-R activity in cells derived from females. The peroxide produced a time, concentration and gender-dependent cytotoxicity, with female-derived cells exhibiting a better viability. *In vivo*, the intracellular total glutathione content was higher in female-derived cells and in cells from more mature babies ; postnatal age and gestational age had a positive effect on the activity of GSSG-R. Oxygen ($F_{iO_2} \geq 0.3$) was associated with a lower activity of GSSG-R in boys, early in life. Considering that glutathione is a central element in the antioxidant defense, these results suggest that specific tissues derived from the baby girl are potentially better protected against an oxidative stress than those derived from the boy.

Key words : Glutathione, glutathione reductase, antioxidants, newborn, female, maturation.

2.2.2 INTRODUCTION

There is increasing evidence that reactive oxygen species disrupt cell integrity and cause tissue injury (1-4), especially when faced with inadequate antioxidant defenses. In several premature newborn animal models the activities of antioxidant enzymes are low (5,6). The immature antioxidant mechanisms of premature infants might furthermore be overwhelmed by the oxidative challenge represented by such therapeutical strategies as oxygen supplementation or intravenous nutrition, which contains large amounts of peroxides (7).

The tripeptide glutathione, which has an intracellular content in the mM range, is a key molecule in the defense against oxidative stress. Glutathione can react directly with free radicals such as $O_2^{\bullet-}$ and HO^{\bullet} (8), and, in reactions involving a peroxidase, it gives an electron to H_2O_2 or organic peroxides. Glutathione is also implicated in the reduction of two important antioxidants, tocopherol and ascorbate (9-12), and, it is involved in other metabolic reactions such as the production of different prostaglandins (13-16). The intracellular ratio of reduced (GSH) on oxidized (GSSG) forms of glutathione plays a role in regulating the function of several proteins such as receptors, enzymes, transcription factors. The cell holds a tight control on this ratio as documented by the relatively high activity and low $k_{m_{GSSG}}$ (60-70 μ M) (17,18) of glutathione reductase (GSSG-R), ensuring a rapid regeneration of GSH. When the activity of peroxidase exceeds the capacity of GSSG-R to regenerate glutathione, the cell exports actively (19) the excess GSSG formed.

Using a human umbilical vein model, we documented (20) that the infusion of the organic peroxide tert-butylhydroperoxide (TBH) produced a gender-related effect on eicosanoids and glutathione, biological markers linked with the cellular red-ox state (21-23). Glutathione is a cofactor of PGE₂ isomerase, while oxidants have an inhibitory effect on PGI₂ synthetase (20,24). In response to the TBH challenge, we found a limited change in the concentration of glutathione in the eluate from female vessels as opposed to a significant increase in the eluate from male-derived vessels. On the other hand, TBH induced an enhancement of PGI₂ and PGE₂ synthesis in female-derived tissue only (20). Overall, those results suggested an increase in the GSSG-R activity and/or in the synthesis of GSH in female-derived tissue. Since the synthesis of glutathione is auto-regulated, a new synthesis occurs only after a prior drop in the cellular concentration. And, since there was no loss of glutathione in tissues derived from girls, we speculated that in order to maintain the intracellular level of glutathione, tissues derived from baby girls had a greater ability to stimulate glutathione recycling.

Numerous experimental observations support the contention that decreased tissue GSH is associated with increased toxicity and disease (25-31). But little information is available on the regeneration of glutathione in tissues of babies undergoing an oxidative stimulus. Taking advantage of the fact that mechanically ventilated newborn infants have frequent endotracheal aspirations as part of their routine care, it was deemed of interest to sample cells from aspirates as a non-

invasive mean of obtaining human tissue, in order to evaluate the maturation of the glutathione-recycling system.

The aim of the present study was to verify the hypothesis that female-derived tissues have a greater ability to stimulate the activity of GSSG-R, and to evaluate if this gender-dependent difference was related to the maturity of the infant.

2.2.3 MATERIALS AND METHODS

A calibrated oxidative challenge was used to confirm the effect of gender on the glutathione-recycling system in endothelial cells. To emphasize the relevance of gender-related differences on antioxidant responses, we further evaluated the glutathione system in cells from tracheal aspirates (TA cells) derived from newborn infants subjected to an oxidative challenge represented by oxygen supplementation and mechanical ventilation. This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee.

A) Experiments :

Endothelial cells.

Endothelial cells were challenged either directly in the umbilical vein or in cell culture.

Endothelial cells challenged directly in the umbilical vein :

Endothelial cells were challenged directly in the umbilical vein in order to determine GSSG-R activity and their viability. Two 10 cm segments of an undamaged umbilical cord were obtained after

term repeat cesarean section following a normal pregnancy. The vessels were prepared as described previously (20,32). Both segments of a same vein were randomly assigned to the control or a test solution. The veins were washed of blood with 20 mL of buffer A (1 mM Na phosphate, 0.14 mM NaCl, 11 mM D-glucose, pH 7.4), filled with either the control or test solutions and incubated at 37°C. Thereafter, the vein was washed with 20 mL of buffer A and the endothelial cells were isolated according to the method of Jaffe et al (33). The vein was filled with a collagenase (CLS II, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) solution 0.5% (w/v) in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, Mississauga, Ontario, Canada), and incubated 15 minutes at 37°C. Cells were collected in a plastic tube containing 10 mL of DMEM with 20 mL of buffer A. After centrifugation at 650g, cells were dispersed in 0.5 mL DMEM. Fifteen μ L of this suspension were collected to determine the number of cells with a hemocytometer (coefficient of variation 11%) and to evaluate the cellular viability. The balance of the suspension was sedimented at 650g, and cells were dispersed in 1 mL of buffer B (125 mM TRIS, 6.36 mM EDTA- Na_4 , pH 7.4) and stored at -70°C.

The control solution consisted of DMEM enriched with 50 mM NaHCO_3 . The test solutions consisted of the control solution to which TBH (Aldrich Chemical Corp, Milwaukee, Wis) was added. The experimental conditions, i.e. the concentrations of TBH and duration of infusions, were similar to those used previously with this model (20).

The null-hypothesis for time and gender differences was tested in the absence of an oxidative stress using 12 human umbilical veins (6 derived from girls and 6 from boys). Two segments of a same vein were randomly assigned to be infused for 0.25 and 3h with the control solution.

The hypothesis that THB affects GSSG-R activity in a gender-dependent fashion was tested in 32 further human umbilical veins ; cellular viability was also measured in the same samples. Both segments of a same vein were randomly assigned to control and test solutions. The following experimental conditions were used : [TBH]= 10^{-4} and 10^{-3} M ; duration of the infusion = 3 and 4 h. For each duration of infusion, the effects of both concentrations of TBH were compared to their own control in a 2 X 2 X 2 design (time X gender X concentration) with 4 samples in each group.

Isolated endothelial cells challenged in culture :

Endothelial cells were challenged in culture to verify if the findings obtained in endothelial cells challenged *in situ* were not an artifact related to the preparation. Umbilical cords were obtained after term repeat cesarean section following a normal pregnancy. Endothelial cells were isolated from the umbilical vein as described above and plated in plastic wells at a density of 10^5 cells per 0.32 cm^2 in 0.2 mL of DMEM + 20% fetal calf serum. After 20h in a 5% CO_2 incubator at 37°C , the media was removed and test solutions were added. After a 3h incubation at 37°C , the media was removed again, and cells were washed with buffer A, and stored in 0.2 mL of buffer B at -70°C until determination of

GSSG-R activity.

The test solutions consisted of DMEM enriched with 50 mM NaHCO_3 to which TBH was added at final concentrations of 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M. The null-hypothesis for gender-related differences in GSSG-R activity was tested in the absence of an oxidative stress in tissues derived from 6 boys and 6 girls.

Cells from tracheal aspirates

After informed parental consent, tracheal aspirates were obtained from newborn infants mechanically ventilated for a compromised respiratory function. At the time of clinically indicated suctioning procedures, tracheal aspirates were sampled according to the following method : isotonic saline solution (0.25 mL x 2) was instilled into the tracheal tube, and suctioned by the nurse into a sterile collection trap (Luki®). The suction catheter was then rinsed with 2.0 mL of saline solution. After centrifugation (1000g, 10min) cells were dispersed in DMEM in order to count their number on a hemocytometer. On average, 1 in 2 samples would yield over 10^6 cells, 90% of which were leukocytes. Cells were stored in buffer B at -70°C until determinations.

All babies received variable levels of oxygen supplementation (FiO_2 : fraction of inspired oxygen) and ventilatory support during the course of their treatment. Before entering the study, all infants received supplemental oxygen to maintain a saturation measured by pulse oxymetry between 90 and 95%. However at the time of tracheal aspirate sampling, the FiO_2 ranged from 0.21 to 1.0. The range in oxygen supplementation led us to separate, a

posteriori, the population between 2 groups of similar sample sizes : those receiving low ($FiO_2 < 0.3$) vs high ($FiO_2 \geq 0.3$) oxygen supplementation. Tracheal aspirates were collected from babies with following postnatal ages : 24-47 h (day 1), 48-71 h (day 2) and 144-167 h (day 6). Gestational age of these infants varied between 26 and 41 weeks. GSSG-R activity and the intracellular content of total glutathione were analyzed as a function of gestational age, postnatal age, gender, and level of oxygen supplementation. In order to confirm the effect of postnatal age, samples from 3 to 4 week-old babies were also collected.

In order to qualify the level of glutathione content and GSSG-R activity of TA cells, systemic leukocytes were isolated. Specimens of cord blood from term (38 to 41 weeks) babies were sampled at delivery by the physician. After isolation of leukocytes on Ficoll-Paque® (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), cells were washed twice in buffer A. Thereafter, cells were diluted in buffer B and stored at -70°C until determinations. The level of total glutathione and GSSG-R activity was measured in cells derived from 6 males and 6 females.

B) Analytical procedures :

Cellular viability was evaluated using the method of exclusion of trypan blue (0.1% in cellular suspension, v/v).

GSSG-R activity was determined according to the method of Becker et al (34). Cellular suspensions were thawed on ice,

centrifuged at 5000g and supernatants were used for the assay. The mixture, sample in buffer B + 0.1 mM NADPH (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec, Canada), was allowed to equilibrate at 30°C for 5 min before adding 1 mM GSSG (Boehringer Mannheim) to start a reaction in which the absorbance at 340 nm drops linearly. The slope of the drop, recorded during 10 min, was quantified using the NADPH molar extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. The activity was expressed in units (U) of GSSG-R/ 10^6 cells ; one U consisted of $1 \mu\text{mol}$ NADPH oxidized/min at 30°C. The level of detection within a 95% confidence limit was 0.05 mU. The direct effect of TBH on purified GSSG-R was also evaluated. The addition of 10^{-3} M TBH to 0.5 mU of GSSG-R (Boehringer Mannheim) had no effect on the determination of GSSG-R activity, after a 3h incubation.

Glutathione was determined according to the method of Griffith (35). Cellular suspensions were thawed on ice, centrifuged at 5000g and supernatants were used for the assay. The mixture, sample in buffer B + 0.6 mM DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) from Aldrich, Milwaukee, Wis) + 0.2 mM NADPH, was allowed to equilibrate at 30°C for 5 min before adding $10 \mu\text{g}$ of purified GSSG-R to start the reaction, in a total volume of 1 mL. The slope of the increasing absorbance at 412 nm during 10 min was quantified using a standard curve (coefficient of variation 3%) made with a known concentration of GSSG. For each set of determinations, a new standard curve was made. The level of detection within a 95% confidence limit was 20 pmol. In a pilot study the GSSG portion of total glutathione was found to be below

the level of detection in TA cells (n=17), even when $FiO_2 \geq 0.3$. Therefore, total glutathione was determined and results were expressed as GSH content.

C) Statistical analysis :

In endothelial cells, the effects of gender, time and concentration of TBH were analyzed by a multi-factorial paired ANOVA. In TA cells from babies up to 6 days of age, the effect of gender, postnatal age and oxygen supplementation were analyzed by a multi-factorial unpaired ANCOVA, with gestational age as covariable. In 3 to 4 week-old infants the effect of gender was analyzed by Student's t-test. The effect of gender in systemic leukocytes was also analyzed by t-test. All comparisons were performed orthogonal. The data are presented as mean \pm SEM. The level of significance was set at $p < 0.05$.

2.2.4 RESULTS

Endothelial cells.

In order to verify the hypothesis of the gender-dependent ability to stimulate the activity of GSSG-R, the effect of the oxidative stimulus on GSSG-R was evaluated in function of the duration of incubation and gender (Figure 1). A significant ($p < 0.05$) interaction between gender and TBH led us to analyze separately the effect of TBH and time according to gender. In male-derived tissue, TBH had no effect. Whereas in female-derived tissue, the activity of GSSG-R was increased according to the level of the oxidative challenge and its duration. Indeed, at the lower

concentration of TBH (10^{-4} M) the specimen had to be stimulated during 4h to detect a significant rise in GSSG-R activity ($p < 0.05$). Whereas, with the shorter duration of incubation, the higher level of TBH (10^{-3} M) stimulated GSSG-R ($p < 0.01$). On the other hand, with the longer incubation period, the activity of GSSG-R under 10^{-3} M TBH was not different than the control.

The oxidant TBH had a time ($p < 0.05$), concentration ($p < 0.01$) and gender-related ($p < 0.05$) cytotoxicity. The viability was greater with the shorter incubation time ($p < 0.05$); TBH produced a significant ($p < 0.01$) cytotoxicity, at the higher concentration; overall, female-derived cells showed a significantly ($p < 0.05$) better viability (Figure 2).

In the absence of an oxidative stimulus, no difference was observed between gender for the cellular viability ($F_{(1,10)} = 0.19$) as well as for the activity of GSSG-R ($F_{(1,10)} = 0.22$). Likewise, the duration of infusion (0.25h vs 3h) had no effect on the viability ($F_{(1,10)} = 0.25$) or on the activity of GSSG-R ($F_{(1,10)} = 0.82$). The power ($1 - \beta$) of these tests was greater than 90%. In this basal state and after 3h of incubation, GSSG-R activity was 2.0 ± 0.3 vs 2.4 ± 0.4 mU/ 10^6 cells in male- and female-derived tissues, respectively.

To verify that the gender-dependent stimulation of GSSG-R found *in situ* was not related to an artifact of the preparation, endothelial cells were challenged after 20h in culture. Figure 3 confirms the findings observed *in situ*, namely that for a given

level of oxidative challenge female-derived cells had a separate response ($p < 0.05$) by increasing GSSG-R activity. However, a dose dependent decrease ($p < 0.05$) in GSSG-R activity was observed at the higher concentrations for tissues derived from both boys and girls. In the absence of an oxidative stimulus, the activity of the GSSG-R was 3.2 ± 0.8 mU/ 10^6 cells in tissues derived from males, and 3.2 ± 0.8 mU / 10^6 cells in females.

Cells from tracheal aspirates.

To confirm the gender-dependent difference in glutathione recycling and to verify if it was related to the maturity of the infants, GSSG-R activity and the level of glutathione were measured in TA cells. **Figure 4** documents a significant positive effect of gestational age ($p < 0.01$) on the activity of GSSG-R. When considering the oxidative challenge represented by the level of oxygen supplementation, there was a significant interaction with gender and postnatal age ($p < 0.05$). The effect of gender and postnatal age on the activity of GSSG-R is presented in **Table 1** according to low ($FiO_2 < 0.3$) vs high ($FiO_2 \geq 0.3$) levels of oxygen supplementation. At the higher level of oxidation there was a significant effect of postnatal age on GSSG-R ($p < 0.05$). Furthermore on day 1, the activity in cells derived from baby girls was significantly higher ($p < 0.05$). At the lower level of oxygen supplementation no effect was detectable. There was no difference in gestational age between these groups ($F_{(1,71)} < 2.51$).

In cells derived from 22 to 27 day-old infants (**Table 2**), the activity of GSSG-R did not differ between gender and was similar

to the level measured in cells derived from 6 day-old infants of similar gestational age.

The intracellular total glutathione content was higher in female-derived cells ($p < 0.05$) and in cells from more mature babies ($p < 0.01$). Since the analysis of data for glutathione revealed no statistical effect of postnatal age ($F_{(2,72)} = 1.22$) nor of oxygen supplementation ($F_{(2,72)} = 1.73$), combined data are presented in **Figure 5**. Furthermore, in cells derived from 22 to 27 day-old infants (**Table 2**) the gender difference was significant ($p < 0.05$) with concentrations in the same range as those derived from 1 to 6 day-old babies of similar gestational age.

In systemic leukocytes used as a source of comparison, no gender difference was observed for the glutathione content (female = 1.74 ± 0.38 vs male = 1.50 ± 0.18 nmol/ 10^6 cells) or for the activity of GSSG-R (female = 4.83 ± 1.34 vs male = 3.92 ± 0.58 mU/ 10^6 cells).

2.2.5 DISCUSSION

The major new finding of this study is that chosen neonatal tissues show a gender-dependent modulation of their glutathione metabolism. In response to an oxidative stress, endothelial cells as well as TA cells derived from baby girls have a greater activity of GSSG-R compared to tissues derived from baby boys.

The observed-female-related induction of GSSG-R occurred in endothelial cells, whether isolated or *in situ*. This could be of biological significance, since it was documented that the reductase

(38) is important in maintaining cellular viability in a tissue challenged by a free radical generating system (39) and because of the recognized importance of endothelial cells as a front line defense against oxidative insults (40-42). The stimulation of the activity of this enzyme was also reported in the lung of newborn rats exposed to hyperoxia (36,37). But it is the first time, to our knowledge, that the stimulation of this antioxidant enzyme is reported in a human tissue, and that it is related to gender. Even though the endothelium represents an important body compartment, a generalization should not be made from results obtained in endothelial cells from umbilical vessels, since physiologic differences (43) as well as differences in the levels of GSSG-R activity exist between vessels of the same species (44,45). On the other hand, the response to a clinically relevant oxidative stress in TA cells (Table 1) underlines that a gender-dependent modulation of GSSG-R is not specific to endothelial cells.

The activities of other enzymes implicated in glutathione reduction such as γ -glutamyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, were also found to be higher in the liver of young female rats (46). But, others reported an absence of gender differences in neonatal GSSG-R activity in lung and liver from rats (47-49), as well as in human neonatal red blood cells (50). Those reports are not at variance with the present findings in challenged cells, since we also documented that in the absence of an oxidative stimulus, GSSG-R activity in endothelial cells did not differ according to gender.

Considering that the intensity of a challenge is function of the level and the duration of the exposure, this might explain why, *in situ*, in female-derived cells from umbilical veins, the stimulation was observed at 10^{-3} M TBH X 3h and at 10^{-4} M TBH X 4h (Figure 1). It is noteworthy that in a previous study with the same model (20), a similar critical level of oxidation (10^{-3} M TBH X 3 h) induced the highest prostaglandin production in female-derived samples. On the other hand, the level of oxidative stress of oxidation 10^{-3} M TBH X 4 h can be interpreted as producing an inhibition of the activity of GSSG-R as suggested by Figure 3. Indeed, in cells plated during 20h, an incubation with the higher level of peroxide produced a marked inhibition of the GSSG-R activity. Therefore, the female related stimulation of GSSG-R activity occurred at critical levels of oxidation, and above those levels oxidants exerted an inhibitory effect in endothelial cells from both genders. This later effect was not observed with the purified enzyme incubated under similar conditions, suggesting a toxic effect on cell function by the peroxide or ensuing radicals. The results from Figure 2 show that TBH induced a cytotoxicity related to the intensity of the challenge as well as to gender, with female derived cells exhibiting a better viability. The comparison of the results obtained after 3 h of incubation as presented in Figures 1 and 2 do not support the presence of a relationship between GSSG-R activity and cellular viability.

All infants received variable levels of oxygen supplementation before enrollment in this study. If oxygen supplemental

contributed to an oxidative stress, and applying the concept of dose-dependent GSSG-R stimulation/inhibition observed in challenged endothelial cells, one would expect to find a higher activity in TA cells derived from girls. However, at the lower oxygen concentrations this was not the case, while at the higher FiO_2 we observed the inhibitory effect only in boys, early in life (Table 1). These findings raise the question as to whether the intensity of the challenge, the considered cellular models, or differing reactive oxygen species could account for the stimulation versus the inhibition. TA cells enabled us to evaluate the activity of GSSG-R at different stages of perinatal development. Although gestational age had a statistically significant effect on reductase activity, comparison with the levels of activity measured in unchallenged systemic leukocytes from term infants suggests that this antioxidant enzyme was relatively efficient even in premature infants, as supported by a previous report in newborn red cells (51).

Depending on gestational age, the level of glutathione in TA cells was 4 to 10 times lower compared to values in systemic leukocytes measured by us or reported by others (52-54). The lower glutathione levels could be interpreted as indirect evidence of a greater oxidative stress in the ventilated infants, as supported by several clinical observations. Indeed, in ventilated newborn infants, there is a positive GSSG arterio-venous gradient across the lung (27), suggesting an oxidation of glutathione in the lungs. Exposure to hyperoxia is also associated with lower plasma

cysteine levels in infants with acute respiratory failure (28). Because cysteine can be a rate-limiting precursor for glutathione production and because blood GSH concentrations are significantly reduced in premature infants with the respiratory distress syndrome (29), it is generally accepted that there is an increased demand for glutathione following an oxidative stimulus (28). Since the reductase is mature and that glutathione concentrations were not correlated with the level of oxygen supplementation, differences in cellular glutathione content would reflect rather a substrate-deficiency or an immaturity of synthesis. In that respect, it is worth noting that TA cells from premature infants born at 26-28 weeks of gestation had the same level of glutathione after 3 weeks of life than after day one, and they exhibited the same gender difference (Table 2). The maturation of glutathione synthesis remains to be studied during the neonatal period.

There was a 3-6 week lag between glutathione content in cells from boys compared to girls (Figure 5). Similar gender-related differences exist in the maturation of other enzymatic systems in different tissues. For instance, it is well known that the maturation of fetal lung from male infants lags by about two weeks behind that of girls (55). The biological significance of this gender-related difference in TA cell glutathione content remains to be proven, especially when considering that the recycling capacity of glutathione was reported to be more important in resisting oxygen toxicity than the intracellular level of glutathione

(56). However, the presence of an inducible GSSG-R activity, a greater cellular viability, and higher glutathione levels suggest that specific tissues derived from the baby girl are potentially better protected against an oxidative stress than those derived from the boy. This is in keeping with the lower morbidity related to oxidative injuries reported in premature infant girls (57-60). Ongoing investigations and therapeutic approaches targeted at reactive oxygen species in neonatal diseases should be oriented specifically according to gender.

Acknowledgments :

The authors are grateful for the work performed by Jocelyne Vallée, research nurse, in collecting the samples at the bed side and in the delivery room.

2.2.6 TABLES AND FIGURES

Table 1 : Effect of Gender and Postnatal Age on the Activity of GSSG-R (mU/10⁶ Cells) in Cells from Tracheal Aspirates in Infants Requiring Low (FiO₂ < 0.3) vs High (FiO₂ ≥ 0.3) Oxygen Supplementation.

	FiO ₂ < 0.3		FiO ₂ ≥ 0.3	
	Male	Female	male	Female
Day 1	5.42 ± 0.96 (n = 6)	4.48 ± 0.94 (n = 5)	2.29 ± 0.54 (n = 8)	5.05 ± 0.82* (n = 7)
Day 2	5.26 ± 0.86 (n = 10)	4.40 ± 0.52 (n = 4)	4.33 ± 0.63 (n = 8)	5.73 ± 0.71 (n = 11)
Day 6	5.99 ± 1.12 (n = 8)	5.86 ± 1.04 (n = 5)	5.71 ± 1.08 (n = 6)	4.83 ± 0.40 (n = 5)

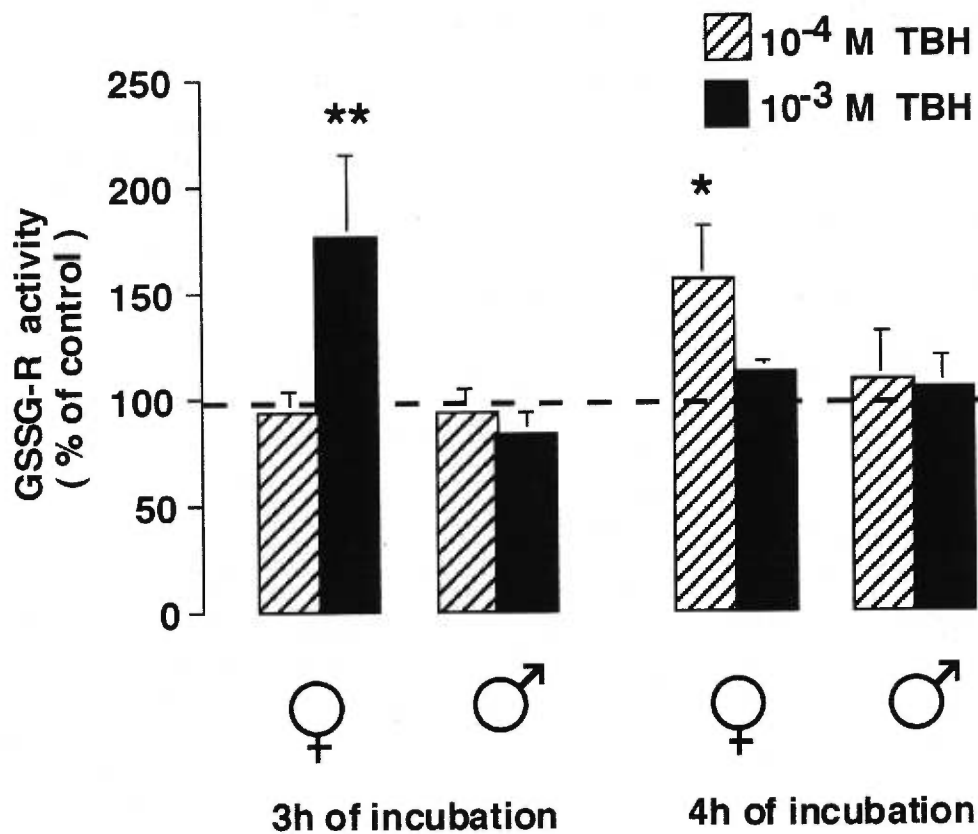
Results are expressed as mean ± SEM; * p < 0.05

Table 2 : Effect of Gender on the Intracellular Content of Glutathione and the GSSG-R Activity in Cells of Tracheal Aspirates from 22 to 27-day Old Infants.

	Gestational Age (wk)	Post-natal Age (days)	Glutathione (pmol/10 ⁶ cells)	GSSG-R Activity (mU/10 ⁶ cells)
Female (n = 3)	27 ± 1	24 ± 2	158 ± 23**	4.32 ± 1.29
Male (n = 3)	26 ± 1	23 ± 1	109 ± 22	6.38 ± 0.87

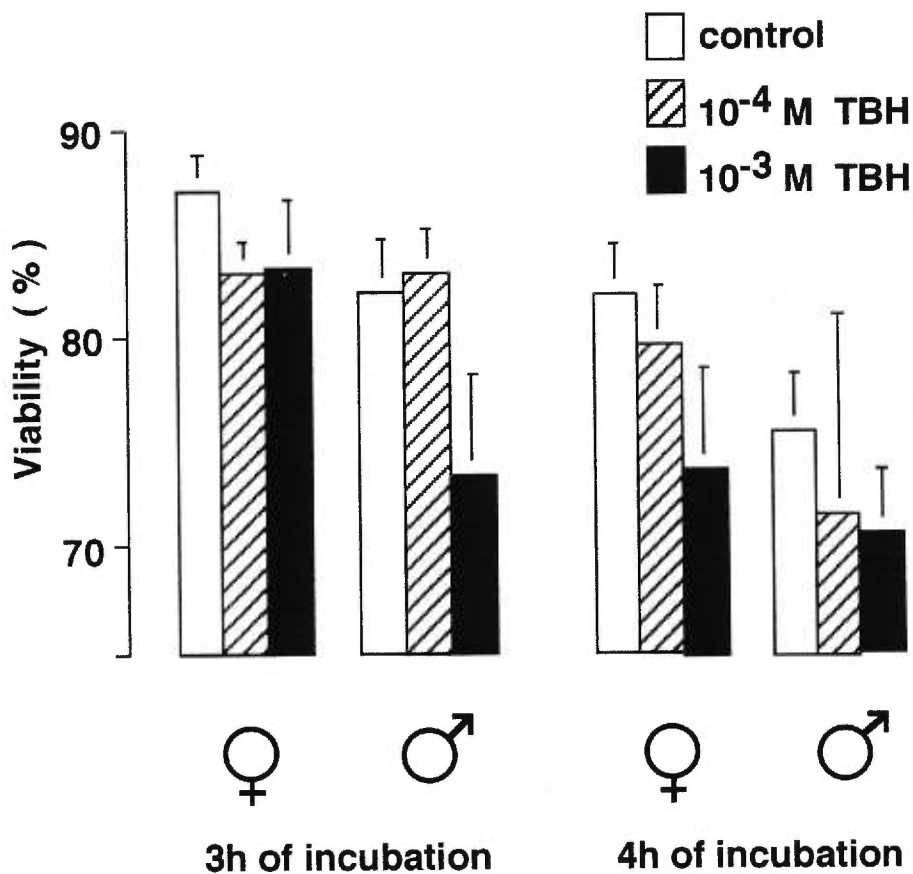
Results are expressed as mean ± SEM; ** p < 0.01.

Figure 1 : Effect of TBH (10^{-4} and 10^{-3} M) on the relative activity of GSSG-R (% of control, mean \pm SEM).



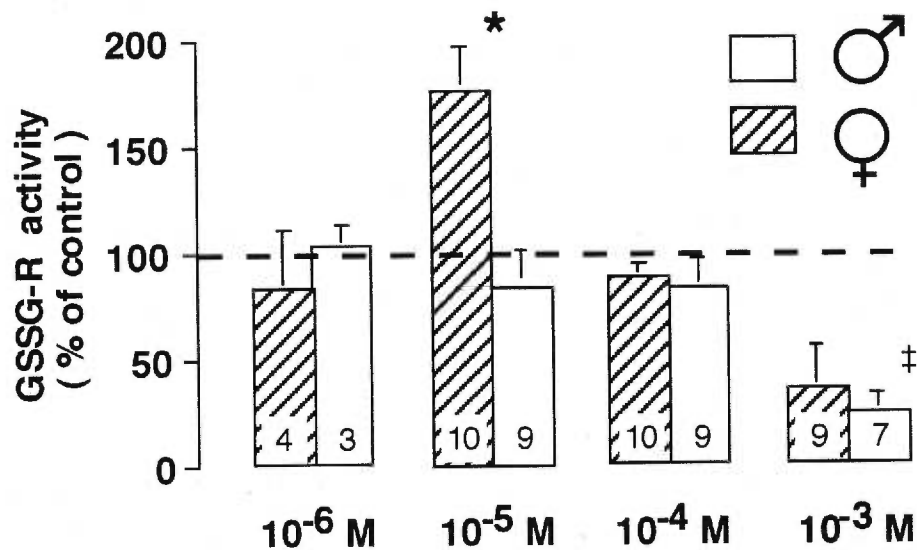
Endothelial cells from 4 umbilical veins of each sex, were isolated after 3 and 4 h of incubation. For each duration of infusion, the effects of both concentrations of TBH were compared to their own control. In female-derived tissue, there was a significant increase after 3h of incubation with 10^{-3} M TBH and after 4h at the lower concentration. (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$).

Figure 2 : Effect of TBH (10^{-4} and 10^{-3} M) on cellular viability (mean \pm SEM).



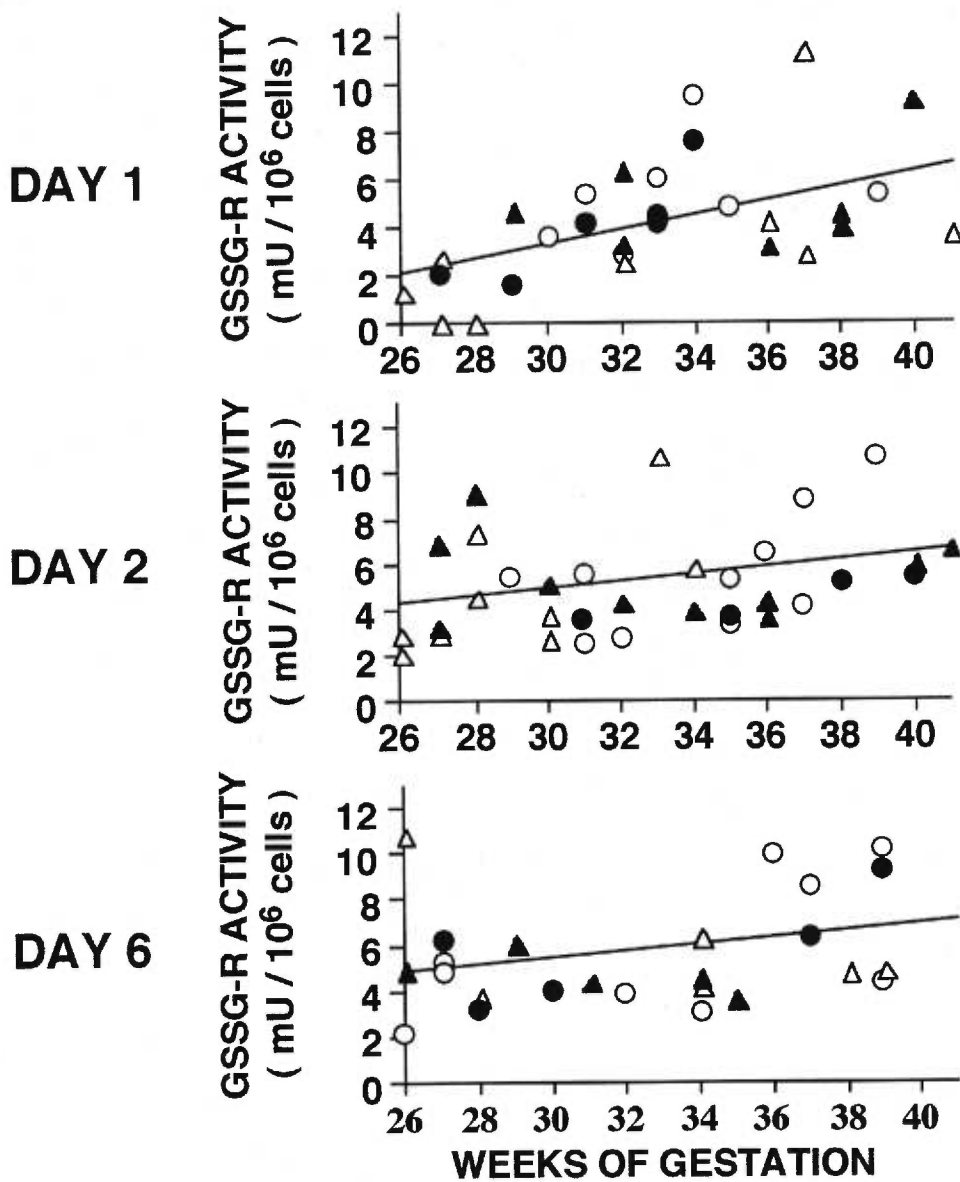
Endothelial cells from 4 umbilical veins of each sex were isolated after 3 and 4 h of incubation. For each duration of infusion, the effects of both concentrations of TBH were compared to their own control. ANOVA showed a statistical difference for time ($p < 0.05$), concentration ($p < 0.01$) and gender ($p < 0.05$). The highest viability was observed in female derived cells.

Figure 3 : Effect of a 3h incubation with TBH (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) on the relative activity of GSSG-R (% of the control with no TBH, mean \pm SEM).



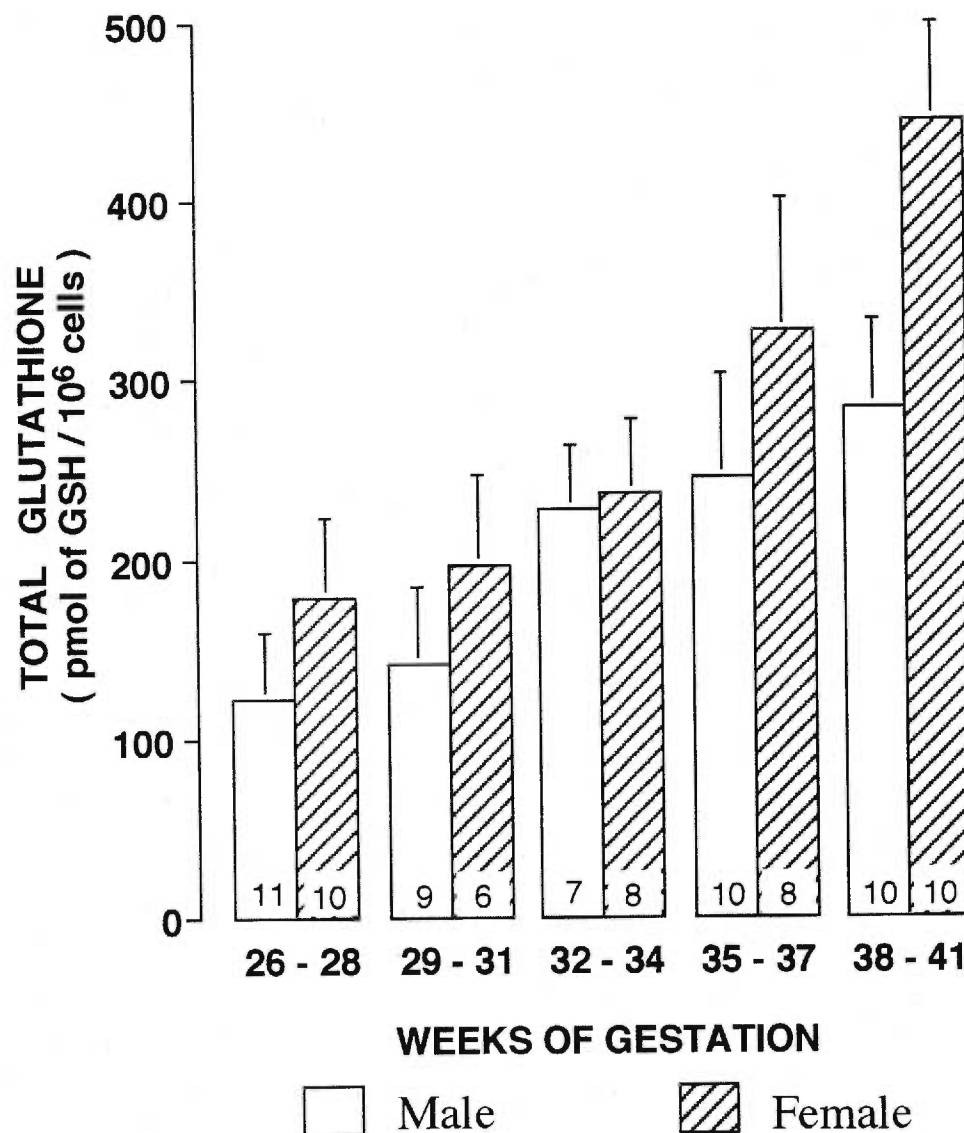
Isolated endothelial cells were plated for 20 h. The number of samples appears at the base of each bar. ANOVA showed a statistical effect of gender at 10^{-5} M TBH ($*=p<0.05$). A dose-dependent decrease was observed at the higher concentrations ($*=p<0.05$).

Figure 4 : Effect of gestational and postnatal age on the activity of glutathione reductase (GSSG-R) (mean \pm SEM) measured in cells from tracheal aspirates of mechanically ventilated newborn infants.



Open symbols represent boys, closed symbols girls. Circles represent low oxygen supplementation ($FiO_2 < 0.3$). ANCOVA showed a statistical effect of gestational age ($p < 0.01$).

Figure 5 : Effect of gender and gestational age on the intracellular content of total glutathione (mean \pm SEM) measured in cells from tracheal aspirates of mechanically ventilated newborn infants.



Since no effect of postnatal age nor of oxygen supplementation was observed, data were combined. The number of samples appears at the base of each bar. ANCOVA showed a statistical effect of gestational age ($p < 0.01$) and of gender ($p < 0.05$).

2.2.7 LIST OF ABBREVIATION

ANCOVA	:	Analysis of covariance
ANOVA	:	Analysis of variance
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle medium
DTNB	:	5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
FiO ₂	:	Fraction of inspired oxygen
GSH	:	Reduced glutathione
GSSG	:	Oxidized glutathione
GSSG-R	:	Glutathione reductase
PGE ₂	:	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	:	Prostaglandin I ₂
TA cells	:	Cells from tracheal aspirates
TBH	:	Tert-butylhydroperoxide

2.2.8 REFERENCES

1. Lunec J. *Free radicals : their involvement in disease process.* An Clin Biochem 1990; 27:172-82.
2. Warner BB, Wispé JR. *Free radical-mediated diseases in pediatrics.* Semin Perinatol 1992; 16:47-57.
3. Kennedy KA. *Dietary antioxidants in the prevention of oxygen-induced injury.* Semin Perinatol 1989; 13:97-103.
4. Frank L. *Antioxidants, nutrition, and bronchopulmonary dysplasia.* Clin Perinato 1992; 19:541-62.
5. Frank L, Sosenko IRS. *Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species.* J Pediatr 1987; 110:106-10.
6. Frank L, Sosenko IRS. *Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: Possible implications for the prematurely born infant.* J Pediatr 1987; 110:9-14.
7. Lavoie JC, Bélanger S, Spallinger M, Chessex P. *Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition : The major contributor to in vitro generation of peroxides.* Pediatrics 1997; 99:E61-70.
8. Winterbourn CG, Metodiewa D. *The reaction of superoxide with reduced glutathione.* Arch Biochem Biophys 1994; 314:284-90.

9. Xu DP, Washburn MP, Sun GP, Wells WW. *Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes.* Biochem Biophys Res Commun 1996; 221:117-21.
10. May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE. *Ascorbate recycling in human erythrocytes : Role of GSH in reducing dehydroascorbate.* Free Rad Biol Med 1996; 20:543-51.
11. Constantinescu A, Han D, Packer L. *Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes.* J Biol Chem 1993; 268:10906-13.
12. Freisleben HJ, Packer L. *Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants.* Biochem Soc Transac 1993; 21:325-30.
13. Salmon JA. *Measurement of eicosanoids by bioassay and radioimmunoassay.* Br Med Bul 1983; 39:227-31.
14. Hempel SL, Wessels D.A, Spector AA. *Effect of glutathione on endothelial prostacyclin synthesis after anoxia.* Am J Physiol 1993; 264:C1448-57.
15. Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hamill AL, Cohn ZA. *Arachidonic acid metabolism in glutathione-deficient macrophages.* Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:1621-5.
16. Moonen P, Buytenhek M, Nugteren DH. *Purification of PGH-PGE isomerase from sheep vesicular glands.* Methods Enzymol 1982; 86:84-91.

17. Minotti G. *Sources and role of iron in lipid peroxidation.* Chem Res Toxicol 1993; 6:134-46.
18. Boggaram V, Larson K, Mannervik B. *Characterization of glutathione-reductase from porcine erythrocytes.* Biochim Biophys Acta 1978; 527:337-47.
19. DeLeve LD, Kaplowitz N. *Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity.* Pharmac Ther 1991; 52:287-305.
20. Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxide-induced oxidation in human neonatal tissue.* Free Rad Biol Med 1994; 16:307-13.
21. Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hamill AL, Cohn ZA. *Arachidonic acid metabolism in glutathione-deficient macrophages.* Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:1621-5.
22. Hempel SL, Wessels DA, Spector AA. *Effect of glutathione on endothelial prostacyclin synthesis after anoxia.* Am J Physiol 1993; 264:C1448-57.
23. Holtzman RB, Adler L, Smith LJ, Shamsuddin M, Hunt CE, Hageman JR. *Loss of oxygen tolerance in newborn rabbits: relationship to changes in eicosanoid and antioxidant levels.* Pediatr Pulm 1989; 7:200-8.
24. Lavoie JC, Chessex P. *The increase in vasomotor tone induced by a parenteral lipid emulsion is linked to an inhibition of prostacyclin production.* Free Rad Biol Med 1994; 16:795-9.

25. Langley SC, Kelly FJ. *Depletion of pulmonary glutathione using diethylmaleic acid accelerates the development of oxygen-induced lung injury in term and preterm guinea-pig neonates.* J Pharm Pharmacol 1994; 46:98-102.
26. Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL. *Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity.* J Appl Physiol 1985; 58:571-4.
27. Smith LJ, Anderson J, Shamsuddin M, Hsueh W. *Effect of fasting on hyperoxic lung injury in mice. The role of glutathione.* Am Rev Resp Dis 1990; 41:141-9.
28. Smith CV, Hansen TN, Martin NE, McMicken HW, Elliott SJ. *Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia.* Pediatr Res 1993; 34:360-5.
29. White CW, Stabler SP, Allen RH, Moreland S, Rosenberg AA. *Plasma cysteine concentrations in infants with respiratory distress.* J Pediatr 1994; 125:769-77.
30. Németh I, Bod D. *Blood glutathione redox ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants with RDS.* Free Radic Biol Med 1994; 16:347-53.
31. Bray TM, Taylor CG. *Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition.* Biochem Pharmacol 1994; 47:2113-23.
32. Lavoie JC, Chessex P. *Biological effects of parenteral bisulfite on human vascular tissues.* Pediatr Res 1993; 33:347-51.

33. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins*. J Clin Invest 1973; 52:2745-56.
34. Becker K, Wilkinson AR. *Flavine adenine dinucleotide levels in erythrocytes of very low birthweight infants under vitamin supplementation*. Biol Neonate 1993; 63:80-5.
35. Griffith OW. *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. Anal Biochem 1980; 106:207-12.
36. Warshaw JB, Wilson CW, Saito K, Prough RA. *The response of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung*. Pediatr Res 1985; 19:819-23.
37. Crouch LS, Prough RA, Kennedy KA, Snyder JB, Warshaw JB. *Rat lung antioxidant enzyme activities and their specific proteins during hyperoxia*. J Appl Physiol 1988; 65:797-804.
38. Frank L. *Antioxidants, nutrition, and bronchopulmonary dysplasia*. Clin Perinatol 1992; 19:541-62.
39. Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. *Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide*. J Clin Invest 1984; 73:706-13.
40. Tsan MF, Danis EH, Del Vecchio PJ, Rosano CL. *Enhancement of intracellular glutathione protects endothelial cells against oxidant damage*. Biophys Res Commun 1985; 127:270-6.

41. Tate R, Repine JE. *Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis 1983; 128:552-9.
42. Rinaldo JE, Rogers RM. *Adult respiratory-distress syndrome. Changing concepts of lung injury and repair*. N Eng J Med 1982; 306:900-6.
43. Charo IF, Shak S, Karasek MA, Davison PM, Goldstein IN. *Prostaglandin I₂ is not a major metabolite of arachidonic acid in cultured endothelial cells from human foreskin microvessels*. J Clin Invest 1984; 74:914-9.
44. Mezetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, Aceto A, Marzio L, Frederici G, Cuccurullo F. *Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery, vein and heart*. J Mol Cell Cardiol 1990; 22:935-8.
45. Michiels C, Toussaint O, Remacle J. *Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells*. J Cell Physiol 1990; 144:295-302.
46. Rikans LE, Moore DR. *Influence of aging on rat liver enzymes involved in glutathione synthesis and degradation*. Arch Gerontol Geriatr 1991; 13:263-70.
47. Yam J, Frank L, Roberts RJ. *Age-related development of pulmonary antioxidant enzymes in the rat*. Proc Soc Exp Biol Med 1978; 157:293-6.

48. Santa Maria C, Machado A. *Effects of development and ageing on pulmonary NADPH-cytochrome c reductase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and thioredoxin reductase activities in male and female rats.* Mechanisms Ageing Develop 1987; 37:183-95.
49. Pinto RE, Bartley W. *The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates.* Biochem J 1969; 112:109-15.
50. Eng LIL, Wan WP, Ng T. *Reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and pyruvate kinase erythrocytes of human newborns and adults in Malaysia.* Br J Haematol 1973; 25:577-84.
51. Clahsen PC, Moison RMW, Holtzer CAJ, Berger HM. *Recycling of glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn.* Pediatr Res 1992; 32:399-402.
52. Martensson J, Jain A, Frayer W, Meister A. *Glutathione metabolism in the lung : Inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects.* Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:5296-300.
53. Roos D, Weening RS, Voetman AA. *Protection of human neutrophils against oxidative damage.* Agents and Actions 1980; 10:528-35.
54. Chen G, Wang S.H, Converse CA. *Glutathione increases interleukin-2 production in human lymphocytes.* Int J Immunopharmac 1994; 16:755-60.

55. Torday JS, Nielsen HC, de Fencel M, Avery ME. *Sex differences in fetal lung maturation.* Am Rev Respir Dis 1981; 123:205-8.
56. Suttorp N, Kästle S, Neuhof H. *Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia.* Lung 1991; 169:203-14.
57. Papageorgiou AN, Colle E, Farri-Kostopoulos E, Gelfand MM. *Incidence of respiratory distress syndrome following antenatal betamethasone : Role of sex, type of delivery, and prolonged rupture of membranes.* Pediatrics 1981; 67:614-7.
58. Brothwood M, Wolke D, Gamsu H, Benson J, Cooper D. *Prognosis of the very low birthweight baby in relation to gender.* Arc Dis Child 1986; 61:559-64.
59. Hoffman EL, Bennett FC. *Birth weight less than 800 grams : changing outcomes and influences of gender and gestation number.* Pediatrics 1990; 86:27-34.
60. Pearson E, Bose C, Snidow T, Ransom L, Young T, Bose G, Stiles A. *Trial of vitamin A supplementation in very low birth weight infants at risk for bronchopulmonary dysplasia.* J Pediatr 1992; 121:420-7.

2.3 DEVELOPMENT OF GLUTATHIONE SYNTHESIS AND γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE ACTIVITIES IN TISSUES FROM NEWBORN INFANTS

Jean-Claude Lavoie, M.Sc.; Philippe Chessex, M.D.

Perinatal Service and Research Center, Hôpital Ste-Justine
Department of Pediatrics, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Address for mailing correspondence and reprints request:

Philippe Chessex, M.D.

Research Center

Hôpital Ste-Justine

3175 Chemin Côte Ste-Catherine

Montreal, Quebec, Canada

H3T 1C5

Telephone: 514 345-4730

Fax: 514 345-4801

This work was supported by grants from Clintec-Baxter Canada
and from the Medical Research Council of Canada (UI 14011)

Running title: Maturation of γ -glutamyltranspeptidase and
glutathione synthesis

FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE

Associate Editor

Free Radical Biology & Medicine

Dr. Jay Forman, Ph.D.

Department Molecular Pharmacology & Toxicology
University of Southern California
5 Zonal Avenue, PSC-516
Los Angeles, CA 90033

(213) 342-3587
Fax: (213) 342-3590
Email: jforman@hsc.usc.edu

October 20, 1997

Philippe Chessex

Research Center
Hôpital Ste-Justine
5 Chemin Cote Ste-Catherine
Montreal, Quebec, CANADA

97-O-97-HF

Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants
Received: 7/8/97
Revised: 9/19/97
Accepted: 10/18/97
Printed: 10/20/97

I am pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication in "FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE". Your cooperation with the reviewers, and with the review process in general is much appreciated.

Final proofs of the article will be sent to you as soon as possible. A reprint order form will also be mailed to you in the near future.

Thank you for submitting your manuscript to "FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE".

Sincerely,



Dr. Jay Forman, Ph.D.

Please send future correspondence to:

Bruce Cooper
Kluwer Science, Inc.
Production Department
1st Floor
West 17th Street
New York, NY 10011



KLUWER
SCIENCE

2.3.1 ABSTRACT

Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants.

Following the observation that the level of glutathione in leukocytes from human newborn infants was lower in preterm and in male infants, a study was designed to document the level of activities of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase during the development of preterm and term newborn infants. Measurements were performed in leukocytes from tracheal aspirates of oxygen dependent infants, and in leukocytes from cord blood. Contrary to the common belief concerning the development of antioxidant activity, the biosynthesis of glutathione was active in leukocytes from preterm infants; and by two days of life the activity of γ -glutamyltranspeptidase reached 3 times the level of that seen in cord blood. Our results suggest that the maturity of these enzymes was not the limiting step in maintaining cellular glutathione levels. This represents new information concerning the maturation of a central antioxidant in tissue derived from preterm and term human newborn infants at risk of oxidant stress. This implies that sources of cysteine crossing freely the cellular membrane could be used by tissues of term and preterm infants to produce glutathione.

Key words: Glutathione, γ -glutamyltranspeptidase, glutathione synthesis, antioxidants, newborn, maturation.

2.3.2 INTRODUCTION

In several animal species the antioxidant capacity of preterm newborn pups is immature (1-3); during the last fifth of gestation there is a surge in the pulmonary activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase (1, 3). Although the maturation of the antioxidant capacity in human tissues remains largely unknown, indirect evidence suggests that it is also low in preterm infants (4) accounting for several complications (5).

Among the antioxidant defense systems of the cell, the tripeptide glutathione (GSH) plays a central role. The high concentration of GSH in epithelial lining fluid (ELF) is important for the defense of the lungs against oxygen toxicity (6, 7). However, in preterm intubated newborn infants this level is 50 times lower than in adults (8) suggesting an impairment in glutathione metabolism. In a previous study (9), we documented that the level of glutathione in leukocytes derived from tracheal aspirates of human newborn infants was dependent upon gestational age, with a lower concentration in preterm and in male infants.

The intracellular level of GSH is linked to the capacity of synthesis, the availability of substrate and the ability of the cell to recycle oxidized glutathione (GSSG) into its active form, reduced glutathione (GSH). GSSG is formed during detoxification of peroxides by glutathione peroxidase. To maintain its red-ox status the cell keeps a tight control over the GSSG/GSH ratio. To do so the cell can recycle GSSG into GSH by the action of

glutathione reductase (GSSG-R). However, in the event of an oxidative stress exceeding the capacity of reduction, the cell losses glutathione by an active export of the excess GSSG formed (10). Under those conditions, two enzymes are responsible for the synthesis of new molecules of GSH: 1) γ -glutamylcysteine synthetase which links a cysteine to the γ -carboxylic function of glutamic acid in a peptidic bound and 2) glutathione synthetase which adds a glycine to the cysteine. However, the availability of cysteine is a limiting step in the synthesis of GSH (11). The lower concentration of glutathione in premature infants (8, 9) could also be related to a low plasma cysteine in this population (12). Apart from exogenous supplementation, the main source of this conditionally essential amino acid for organs such as the lungs and the endothelium is plasma glutathione (13) originating from the liver (14). The glutathione in ELF could be a further source for pulmonary cells. However, in preterm infants this level is similar to that of plasma (8). Cysteine is released from extracellular glutathione into the cell by the action of γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), followed by the action of membranar dipeptidases (15). An important pathway providing substrate for glutathione synthesis is the active transport of cysteine and cystine through the cell membrane (14, 16). An anionic amino acid transport system and the γ -GT were reported to be responsible each for 50% of the uptake of cystine by epithelial cells (17, 18). Since the major source of plasma cysteine remains the circulating glutathione (19, 20), the action of γ -GT is of prime necessity. The immaturity of this enzyme

could limit the availability of substrates for glutathione synthesis.

In leukocytes derived from tracheal aspirates of intubated newborn infants, we showed that the activity of glutathione reductase did not account for the observed gender-related and maturational variations in glutathione (9). Therefore, the objective of the present study was to document the state of the activities of glutathione synthesis and γ -GT during the development of newborn infants.

2.3.3 MATERIALS AND METHODS

Using the same techniques as described previously (9) cells from tracheal aspirates (TAC) of newborn infants were sampled. The samples for the present study came from a further group of infants. Since TAC were derived from an environment suspected to entertain an oxidant stress, cells of cord blood were also evaluated as a different source of cells from a non stimulated environment. The effect of gestational age (26 to 41 weeks), post-natal age (24-48h = day 1, 49-72h = day 2, and 120-144h = day 6 of life), gender and oxygen supplementation were sought on the activity of GSH synthesis and of γ -GT in either type of cells when indicated. This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee.

Materials

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), L-serine, glycine, glycyglycine, L-glutamic acid, L-cysteine-HCl, DL-buthionine-

[S,R]-sulfoximine (BSO), glutathione-S-transferase (GST), γ -glutamyl-p-nitroanilide and p-nitroaniline were purchased from Sigma, Mississauga, Ontario, Canada; monochlorobimane was purchased from Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Ficoll-Paque[®] was obtained from Pharmacia, Baie d'Urfé, Que, Canada; dithiothreitol, ATP and glutathione (GSH) were obtained from Boehringer Mannheim, Ville St-Pierre, Québec, Canada.

Cells from tracheal aspirates

The sampling was performed in term and preterm newborn infants tracheally intubated and mechanically ventilated. The group of preterm infants was ventilated for a compromised respiratory function, while the subjects in the group of term patients (≥ 38 weeks of gestation) were ventilated postoperatively, with the exception of four patients who had a respiratory condition such as meconium aspiration. Oxygen was provided in order to maintain saturation as measured by pulse oxymetry between 90 and 95 %, and nutritional supplementation was managed by the attending physician. At the time of tracheal aspirate sampling, the FiO_2 (fraction of inspired oxygen) ranged from 21% to 100%. After informed parental consent, tracheal aspirates were obtained by the nurses at the time of clinically indicated suctioning procedures. Isotonic saline (2 x 0.25 mL) was instilled in the tracheal tube, and aspirated into a sterile collection trap (Luki[®]). The tube was rinsed with 1 mL of saline solution. After centrifugation at 1000g for 10 minutes, cells were dispersed in DMEM and counted on a hemocytometer. As reported (9), over 90% of the cells were leukocytes. Cells placed

in 50 mM TRIS + 0.1 mM EDTA buffer (pH 7.60) were stored at -70°C until determination.

Leukocytes from cord blood

Specimens of cord blood from a different set of term (38-41 weeks) and preterm (27-33 weeks) infants were sampled by the attending physician at the time of uncomplicated delivery. Isolation of systemic leukocytes was performed using a gradient of Ficoll-Paque®. Whole blood was centrifuged at 2500g. The buffy coat was diluted in PBS and put on a Ficoll-Paque® gradient (70, 90 and 100% in PBS). After centrifugation at 400g, leukocytes formed a band at the interface 70-90%, erythroblasts were in the middle of the 90% section, and erythrocytes were at the bottom of the tube. Leukocyte and erythroblast fractions were isolated, washed in PBS, counted on a hemocytometer, aliquoted and frozen (-70°C) until biochemical determinations. Since premature babies have a high erythroblast count the enzymatic activities were also determined in this cell fraction in order to discuss the possible contamination of the leukocyte fractions by the nucleated red cells.

Glutathione synthetic activity

The assay was adapted from a published method (21, 22). In brief, the overall capacity of the cells to produce glutathione was evaluated by providing at once all substrates required by both enzymes and measuring the final product, GSH. To evaluate the maximum rate of reaction (V_{max}) we provided all substrates at saturating concentrations (over 10 times the K_m), except for

cysteine. In the case of cysteine we used a concentration equal to the reported K_m of γ -glutamylcysteine synthetase (0.35 mM) (23), because thiol functions produce an important background noise over a one hour reaction. Indeed, using a cysteine concentration (3.5 mM) 10 times over the K_m , the detection of newly synthesized glutathione was masked by the background noise. With a concentration of cysteine corresponding to the K_m of the enzyme, half of the maximal velocity of the reaction was measured.

In a buffer pH 7.3 (50 mM TRIS + 10 mM L-serine + 20 mM Na-borate), the sample was preincubated at 37°C for 30 minutes, half in presence of 40 mM BSO. This concentration of BSO was sufficient to inhibit 96.3 ± 3.7 % ($n=3$) of glutathione synthesis. After this step, the sample (more than 10^6 cells) was incubated at 37°C in presence of 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM L-serine, 10 mM Na-borate, 5 mM glycine, 5 mM L-glutamic acid, 0.35 mM L-cysteine-HCl, 0.1 mM dithiothreitol, 100 μ M monochlorobimane, 1 U/mL GST, 1.8 mM ATP at pH 7.3. The reaction was started by adding the sample. The fluorescence (385-478 nm on a Perkin Elmer fluorometer LS50) was read each 10 minutes for one hour. The reaction is linear ($r^2 > 0.97$) for up to 120 minutes. The standard curve was obtained by the reaction of GSH (0-10 nmol) with 100 μ M monochlorobimane catalyzed by 1 U/mL GST in 50 mM TRIS buffer pH 7.3. The reaction was completed in one minute. The slope (unit/h) of the difference between half of the sample without and half with BSO, was divided by the slope (unit/nmol GSH) of the standard curve. Results were reported in

nmol of GSH formed / h / 10^6 cells. The threshold of the assay was 70 pmol of GSH. The interassay coefficient of variation was 8% (n=10).

γ -Glutamyltranspeptidase activity

The determination of γ -GT activity was performed as described previously (24, 25). In 90 mM TRIS buffer, pH 8.0, the sample was incubated at 37°C in presence of 105 mM glycylglycine and 4.5 mM γ -glutamyl-p-nitroanilide. The absorbance at 405 nm was recorded during 10 minutes. After subtraction of the blank (sample replaced by buffer), the slope (abs/min) of the sample was divided by the slope (abs/ μ mol) of the standard curve of p-nitroaniline. The activity was reported as nmol of p-nitroaniline formed / min / 10^6 cells. The threshold of the assay was 90 pmol of p-nitroaniline.

Statistics

All comparisons were performed orthogonally. The data are presented as mean \pm s.e.m. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Cells from tracheal aspirates

The effect of gestational age, post-natal age and gender were analyzed by a multifactorial ANCOVA. For glutathione synthesis the covariable was post-natal age, while for γ -GT activity the covariable was gestational age. Since samples from term and preterm infants were obtained after differing conditions (\pm surgery), the maturation of glutathione synthesis was analyzed as

follows: term versus preterm and within-preterm. Because the activity of the enzyme can be modulated by the oxidant load (26-29) we searched for the effect of parameters of ventilation such as F_{iO_2} by a multiple linear regression.

Leukocytes from cord blood

Since the Bartlett's χ^2 test showed a significant heterogeneity of variances, the data transformed by natural logarithm were analyzed by factorial ANOVA. Analyzed variables were gender and gestational age. The paired Student's t test was used to compare activities found in leukocytes to those found in erythroblasts.

2.3.4 RESULTS

Glutathione synthesis

The effects of gender, post-natal age and gestational age were assessed for samples obtained from different intubated infants. Independently of gender and gestational age, samples obtained cross-sectionally on days 1 (n=10), 2 (n=19) and 6 (n=9) of life had no effect ($F_{(1,29)} = 0.50$) on glutathione synthesis. The data presented in **Figure 1** document the effects of gestational age and gender. Gestational age affected glutathione synthesis, while the effect of gender was not significant ($F_{(1,29)} = 0.02$). Within the group of preterm infants (26-37 weeks) there was a significant effect as described by a linear drop ($F_{(1,29)} = 5.35$, $p < 0.05$). The preterm infants with the greater immaturity (26-29 weeks) presented the highest activity with 5.67 ± 0.92 nmol of GSH

formed/ h / 10^6 cells, while the activity in the 34-37 weeks group was 2.34 ± 0.38 nmol / h / 10^6 cells. This last value was similar to those obtained in circulating leukocytes from normal subjects in the pediatric to adult age range (data not shown). Within the group of term infants, they were all intubated postoperatively, except for one subject with meconium aspiration whose TAC had a synthetic activity of 0.45 compared to 4.75 ± 1.02 nmol / h / 10^6 cells for the whole group.

Within the samples from preterm infants, a subsequent analysis led us to document that FiO_2 had a significant positive effect ($p < 0.05$) on the biosynthetic activity of glutathione. However, the mean FiO_2 was not different between the three gestational age sub-groups presented in Figure 1 (33.3 ± 3.9 , 32.9 ± 2.5 , 30.3 ± 2.7 %). From the multiple regression analysis performed on samples from the preterm population ($n=27$) the combined effect of gestational age and oxygen supplementation accounted for 42% of the variation in biosynthetic activity in TAC. Within the samples from term infants ($n=8$), which had a similar level of oxygen supplementation ($\text{FiO}_2=35.4 \pm 3.3$ %), there was no detectable effect of gestational age or FiO_2 .

Before day 3 all infants were receiving an intravenous glucose solution plus electrolytes. By day six, 5 infants (29.8 ± 0.8 weeks gestational age) were receiving total parenteral nutrition with a cysteine-free amino acid solution as sole source of nutrients; the remaining infants (36.0 ± 2.9 weeks gestational age) received dextrose + electrolytes, only. There was no difference in synthetic

activity between those receiving dextrose + electrolytes or total parenteral nutrition.

Leukocytes from cord blood obtained from preterm and term infants served as a further source of cells to study the development of glutathione biosynthetic activity. The level of biosynthetic activity found in leukocytes from term and preterm cord blood is presented in Table 1, in which it appears that there was a significant interaction between gender and maturation ($F_{(1,18)} = 5.36, p < 0.05$); the preterm infants had a 3 fold higher activity, while in the term group baby boys ($n=6$) presented the lowest capacity of synthesis ($F_{(1,18)} = 5.44, p < 0.05$). Since the leukocyte fraction on Ficoll-Paque® could have been contaminated by erythroblasts, the activity of glutathione synthesis was also sought in these cells. The difference between leukocytes and erythroblasts was not significant ($t = 1.91, n = 5$).

γ -Glutamyltranspeptidase activity

The TAC collected to measure the activity of γ -GT were derived from different subjects, out of which 3 were intubated postoperatively. In contrast to the biosynthesis of GSH, post-natal age had a significant ($F_{(2,18)} = 6.78, p < 0.01$) positive effect on the activity of γ -GT. The activity increased from 1.29 ± 0.20 on day 1 to 6.07 ± 1.41 nmol / min / 10^6 cells after 6 days. Since the effect of gestational age and gender were not significant ($F_{(1,18)} = 0.41$ and 0.59 respectively), the combined data presented in Figure 2 show only the effect of post-natal age. The multiple linear regression analysis revealed that the combined effects of

gestational age and FiO_2 was not statistically significant ($r^2 = 0.05$). There was no difference in γ -GT activity between those receiving dextrose + electrolytes or total parenteral nutrition.

In systemic leukocytes, gestational age had a positive effect ($F_{(1,20)} = 23.70$, $p < 0.01$) on γ -GT activity. In the preterm group the activity was 0.16 ± 0.03 while in the term group it was 0.81 ± 0.14 nmol / min / 10^6 cells. Gender was not a significant ($F_{(1,20)} = 0.05$) variable (Figure 2). The activity of the enzyme measured in circulating leukocytes at term was close to that observed in TAC derived from babies on the first day of life. Since the leukocyte fraction on Ficoll-Paque[®] could have been contaminated by erythroblasts, γ -GT activity was also measured in these cells. The activity of γ -GT in erythroblasts was 5.8 ± 2.7 % ($n = 6$) of that measured in leukocytes ($t = 8.99$, $p < 0.01$).

2.3.5 DISCUSSION

We have previously demonstrated that the level of glutathione in human leukocytes derived from tracheal aspirates (TAC) increased with gestational age and was higher in girls. Furthermore, levels of glutathione were 4 times lower in TAC from term intubated infants than in unstimulated leukocytes from cord blood (9). These results suggested a possible immaturity of the formation of GSH, especially when cells were in an oxidant environment. The findings of the present study suggest that the immaturity of the cell to produce glutathione is

not at the biosynthetic level nor at the level of γ -GT activity. Indeed, the biosynthesis of glutathione was active in leukocytes from preterm infants, and by two days of life the activity of γ -GT reached 3 times the level of that seen in cord blood. This suggests that the availability of cysteine might be the major factor influencing the low glutathione levels found in preterm and male newborn infants. Globally, the results bring new information concerning the maturation of antioxidants in human neonatal tissue.

With the same model, but in cells derived from different infants, there was an apparent uncoupling between the measured biosynthetic activity and the reported cellular content of glutathione. In TAC from 26 to 37 "weekers" the more immature infants had the highest activity (Figure 1), while we previously reported that the lowest glutathione content was observed in the less mature infants (9); and in systemic leukocytes, the highest activity was measured in the preterm group in which the amount of glutathione in plasma (30) and in erythrocytes (31) is known to be low. One interpretation of these results is that a low concentration of glutathione stimulates the production of its enzymes. This is supported by the fact that a drop in intracellular glutathione can induce the synthesis of new molecules of the catalytic heavy sub-unit of γ -glutamylcysteine synthetase (23, 32). Hence, the observed biosynthetic activity did not explain but eventually confirmed the lower GSH status found in premature babies.

Another possible explanation for these results is the activation of the transcription of the gene coding for the heavy chain of γ -glutamylcysteine synthetase by oxidants (23, 29, 32, 33). Similarly, it is well documented that an oxidant environment stimulates several antioxidant enzymes. In endothelial cells derived from the umbilical vein of term infants we demonstrated that the oxidant tert-butylhydroperoxide increased the activity of glutathione reductase (9), and in the lungs of term newborn animals exposed to hyperoxia Lee Frank documented a stimulation of catalase, peroxidase and superoxide dismutase (1, 3). This response was not elicited in tissues from preterm animals (34). Therefore, it is widely believed that this mechanism is not operational during prematurity. Our findings do not exclude such a stimulation by oxygen since FiO_2 had a positive effect in ventilated premature infants.

TAC sampled from term infants for GSH synthetic activity, came all but one from operated infants. The value of the sample from the non-operated term infant was 10 times lower than the others, thereby following the same drop observed over the maturation of preterm infants in TAC as well as in cord blood leukocytes. This potentially lower activity of GSH synthesis in non-operated term infants would fit the interpretation proposed above, that the synthetic activity is related to the cellular GSH content. The effect of surgery on glutathione synthesis is to our knowledge unknown. But the discrepancy in the results from TAC between preterm and operated term infants argues in favor of a postoperative stimulation. Alternatively there was no detectable effect of

surgery on γ -GT activity in TAC.

A gender related difference in biosynthetic activity was observed only in leukocytes from term infants not stimulated by either a low glutathione level or an oxidant environment. We have observed a gender dependent effect on glutathione metabolism (GSSG-R, total glutathione and biosynthetic activity) in different tissues (endothelial cells, TAC and leukocytes from cord blood) and experimental conditions (*in situ* vascular model, cells in culture and isolated cells) (9, 35). The fact that these observations always favor a greater antioxidant capacity in tissues derived from girls, suggests that they are not a fortuitous finding. Even if premature infant girls have a lower incidence of morbidity associated to oxidant-induced diseases (36, 37), the scope of the discussed gender-related effect should be interpreted with caution in view of the interactions between glutathione metabolism and other antioxidants.

The method used in the present study enabled us to measure, directly in a one step, the global rate of GSH formation. Had the results demonstrated an immaturity of glutathione production, the activity of each enzyme involved in GSH synthesis would have been evaluated. The activity of GSH synthesis measured with our assay was similar to that reported for the rate of GSH formation in rat hepatocytes (2 nmol / h / mg protein) (38). The later was determined by measuring fluorimetrically the level of GSH after derivatisation with o-phthalaldehyde, at the beginning and the end of the incubation.

As judged by the results in cord blood, γ -GT activity in utero is low. There is a rise in the activity of γ -GT with gestational age as found in rat lungs (39). But we can not exclude a possible dilution effect due to a contamination of the leukocyte fraction by erythroblasts in which the activity of γ -GT was low. However, the measured activity was similar to that reported for human mononuclear cells : 0.33 ± 0.13 nmol / min / 10^6 cells (40). The effect of post-natal age on the activity of γ -GT in TAC could represent an effect of oxygen on the synthesis of this enzyme. Indeed, the oxygen (26, 28) as well as H_2O_2 or superoxide anion (27, 29), have been reported to regulate γ -GT activity. Different promoters for the gene coding for γ -GT can be regulated according to the level of O_2 . In rat lung the mRNA of γ -GT increased when O_2 reached 21% (26) and the maximal level was observed after 10 days (26). Since the oxygen concentration surrounding the TAC was at least 21%, the post-natal age should have a positive effect on γ -GT. This could explain why the effect of FiO_2 and gestational age were undetectable as the oxygen concentration surrounding the TAC was at least 21% from the first day of life.

The higher γ -GT activity observed in infants of 6 days of age could furthermore be related to the high concentrations of H_2O_2 (27, 29) infused with the solutions of parenteral nutrition(41). But, there was no difference in the activity of γ -GT measured in TAC between those receiving parenteral nutrition or dextrose only, which has a low peroxide content. However, the significant difference in gestational age between these 2 groups might be a

confounding factor explaining why the presence of H₂O₂ seems to play a minor role relative to the time-dependent effect of O₂.

Inhibiting the activity of γ -GT in human endothelial cells and rat brain has been shown to decrease cellular cysteine (42) and glutathione concentrations (18). The fact that, in cells from tracheal aspirates, post-natal age did not affect the level of glutathione (9) and that it had a positive effect on γ -GT activity, supports the concept that the activity of this enzyme is not a limiting factor in the formation of GSH in our model. Therefore, as for glutathione synthesis, the noted variation in γ -GT activity does not explain the low level of GSH observed in TAC (9) and why it is gender related and dependent on gestational age.

Following an oxidative stress, a lower concentration of glutathione in fluid from bronchoalveolar lavage was associated, in preterm infants, with the development of chronic lung disease (43). This observation supports that premature babies are at risk of clinical complications related to the immaturity of their antioxidants. In order to improve the antioxidant status of premature infants, the addition of glutathione precursors has been considered (44-47). It remains to be verified if strategies aimed at maintaining an intracellular level of glutathione in that population will directly improve the antioxidant capacity. Although we do not know if there is any deficiency in activity or oxidant inducibility of the cysteine transport system, our present findings suggest that glutathione or sources of cysteine crossing freely cell membranes, such as pro-cysteine (44), could be used by tissues from term and

preterm newborn infants to produce glutathione.

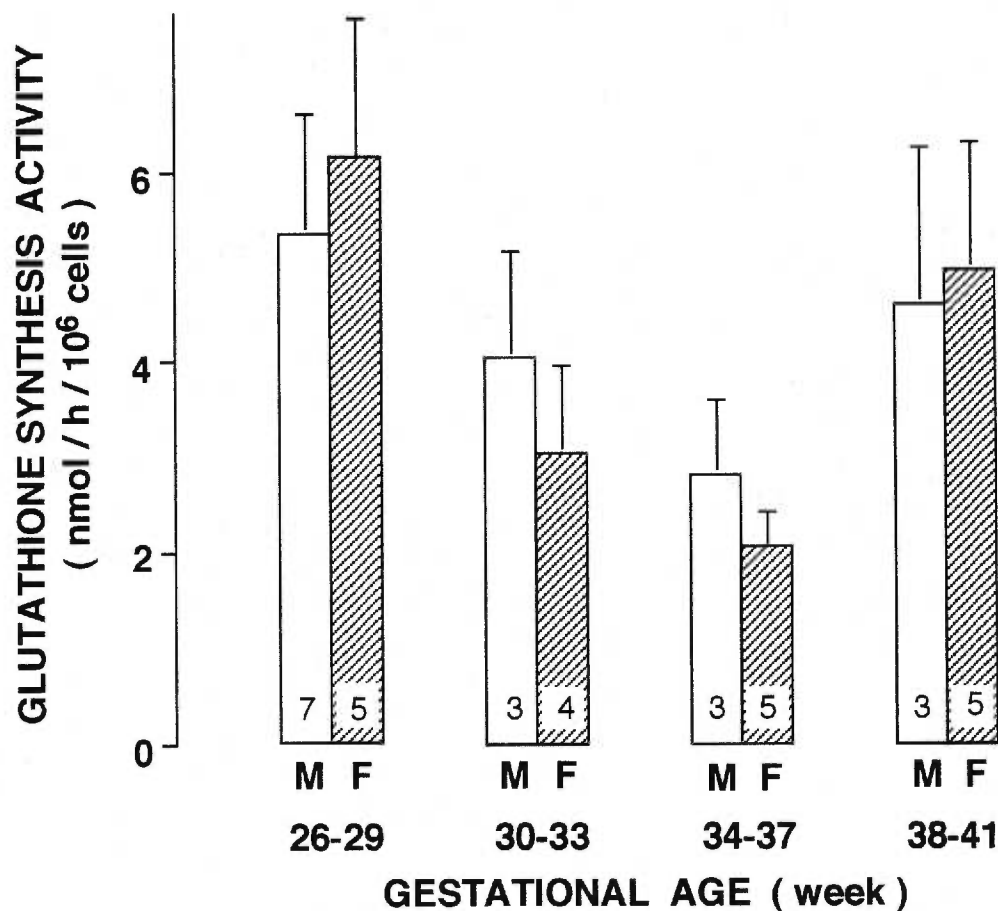
2.3.6 TABLE AND FIGURES

Table 1 : Activity of glutathione synthesis in leukocytes from cord blood.

	≤ 33 weeks (30.3 ± 0.6, n=10)	≥ 38 weeks (38.8 ± 0.3, n=12)
male	6.73 ± 1.76	0.98 ± 0.24
female	4.40 ± 0.83	2.01 ± 0.31 *

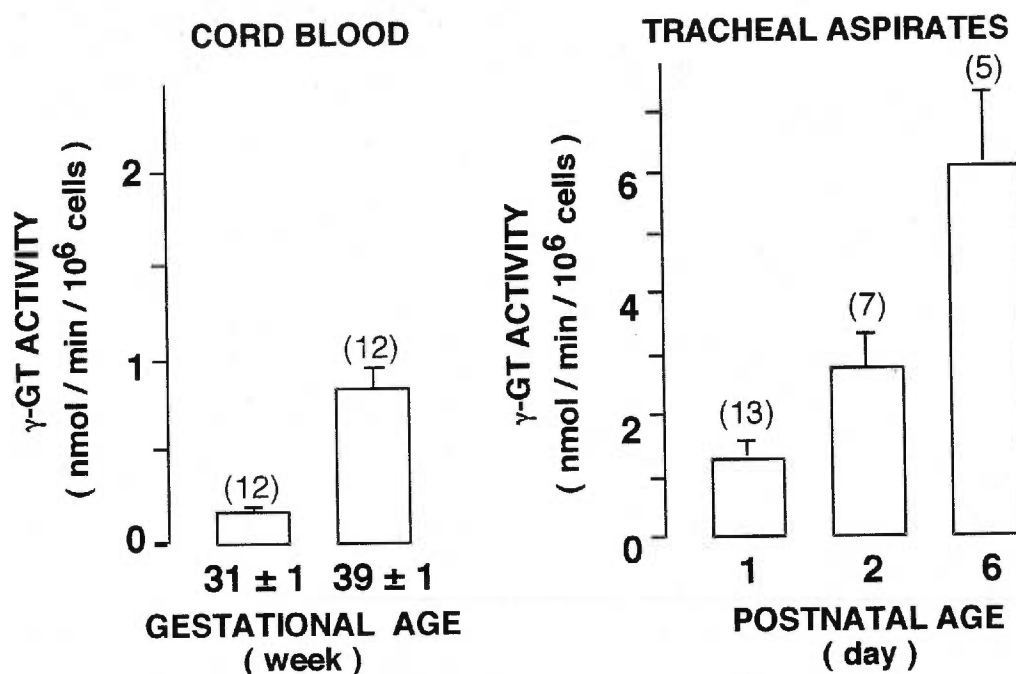
The synthetic activity (mean ± sem) was expressed in nmol of GSH formed / h / 10⁶ cells. * : p < 0.05 between male and female.

Figure 1 : Glutathione synthesis in cells from tracheal aspirates (TAC) derived from ventilated and oxygen-dependent infants of different gestational ages.



Since the effect of postnatal age (days 1 to 6) was not statistically significant, data were combined. Within the samples from preterm infants, the drop between 26-29 and 34-37 weeks was significant ($p < 0.05$). The preterm infants differed from the term infants who were all in a postoperative state, except for one subject. There was no effect of gender. Data are presented as mean \pm s.e.m. with the sample size noted at the bottom of each bar.

Figure 2 : γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) activity of leukocytes derived from cord blood, and from tracheal aspirates (TAC).



In the left pannel: γ -GT activity of leukocytes derived from cord blood of term (>38 weeks gestation) and preterm (<32 weeks gestation) infants. The lowest ($p < 0.01$) activity was measured in the preterm group. There was no statistically significant difference between gender. Data are presented as mean \pm s.e.m. with the sample size noted at the top of each bar.

In the right pannel: γ -GT activity in leukocytes from TAC derived from ventilated and oxygen-dependent infants of different postnatal ages. Since the effect of gestational age (26 to 41 weeks) and gender were not statistically significant, data were combined. The activity increased with postnatal age ($p < 0.01$). Data are presented as mean \pm s.e.m. with the sample size noted at the top of each bar.

2.3.7 LIST OF ABBREVIATION

ANCOVA	:	Analysis of covariance
ANOVA	:	Analysis of variance
BSO	:	DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximine
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle medium
ELF	:	Epithelial lining fluid
FiO ₂	:	Fraction of inspired oxygen
γ-GT	:	γ-glutamyltranspeptidase
GSH	:	Reduced glutathione
GSSG	:	Oxidized glutathione
GSSG-R	:	Glutathione reductase
GST	:	Glutathione S-transferase
TAC	:	Cells from tracheal aspirates

2.3.8 REFERENCES

- 1 Frank L, Sosenko IRS. *Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: Possible implications for the prematurely born infant.* J Pediatr 1987; 110:9-14.
- 2 Frank L. *Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity.* Free Radical Biol Med 1991; 11:463-94.
- 3 Frank L, Sosenko IRS. *Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species.* J Pediatr 1987; 110:106-10.
- 4 Lindeman JHN, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJHM, Berger HM. *The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies.* Pediatr Res 1989; 26:20-4.
- 5 Kennedy KA. *Dietary antioxidants in the prevention of oxygen-induced injury.* Seminars in Perinatology 1989; 13:97-103.
- 6 Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. *Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione.* J Appl Physiol 1987; 63:152-7.
- 7 Buhl R, Holroyd KJ, Mastrangeli A, Cantin AM, Jaffe H A, Wells FB, Saltini C, Crystal RG. *Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals.* Lancet 1989; 2:1294-8.

- 8 Grigg J, Barber A, Silverman M. *Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in intubated premature infants*. Arch Dis Child 1993; 69:49-51.
- 9 Lavoie JC, Chessex P. *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues*. Free Radical Biol Med 1997; 23:648-57.
- 10 DeLeve LD, Kaplowitz N. *Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity*. Pharmac Ther 1991; 52: 287-305.
- 11 Deneke SM, Fanburg BL. *Regulation of cellular glutathione*. Am J Physiol 1989; 257:L163-73.
- 12 Picone TA, Daniels TA, Ponto KH. *Cord blood tryptophan concentrations and total cysteine concentrations*. J Parent Enter Nutr 1989; 13:106-7.
- 13 Deneke SM, Susanto I, Vogel KA, Williams CE, Lawrence RA. *Mechanisms of use of extracellular glutathione by lung epithelial cells and pulmonary artery endothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12:662-8.
- 14 Bannai S, Tateishi N. *Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals*. J Membrane Biol 1986; 89:1-8.
- 15 Habib GM, Barrios R, Shi ZZ, Lieberman MW. *Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with γ -glutamyl transpeptidase*. J Biol Chem 1996; 271:16273-80.

- 16 Meier T, Issels RD. *Promotion of cyst(e)ine uptake. Methods in Enzymology* 1995; 252:103-12.
- 17 Sweiry JH, Sastre J, Viña J, Elsässer HP, Mann GE. *A role for γ -glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system x_c^- in cystine transport by a human pancreatic duct cell line. J Physiol* 1995; 485:167-77.
- 18 Cotgreave IA, Schuppe-Koistinen I. *A role for γ -glutamyl transpeptidase in the transport of cystine into human endothelial cells: relationship to intracellular glutathione. Biochim Biophys Acta* 1994; 1222:375-82.
- 19 Gilbert HF. *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 1990; 63:69-172.
- 20 Meister A, Anderson ME. *Glutathione. Ann Rev Biochem* 1983; 52:711-60.
- 21 Fernández-Checa J, Kaplowitz N. *The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. Anal Biochem* 1990; 190:212-9.
- 22 Kannan R, Tang D, Mackic JB, Zlokovic BV, Fernandez-Checa JC. *A simple technique to determine glutathione (GSH) levels and synthesis in ocular tissues as GSH-bimane adduct: Application to normal and galactosemic guinea-pigs. Exp Eye Res* 1993; 56:45-50.

- 23 Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ. *γ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC.* Am J Physiol 1994; 267:L414-21.
- 24 Rosalki SB, Tarlow D. *Optimized determination of γ -glutamyltransferase by reaction-rate analysis.* Clin Chem 1974; 20:1121-4.
- 25 Stromme JH, Theodorsen L. *γ -Glutamyltransferase: Substrate inhibition, kinetic mechanism, and assay conditions.* Clin Chem 1976; 22:417-21.
- 26 Joyce-Brady M, Oakes SM, Wuthrich D, Laperche Y. *Three alternative promoters of the rat γ -glutamyltransferase gene are active in developing lung and are differentially regulated by oxygen after birth.* J Clin Invest 1996; 97:1774-9.
- 27 Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. *γ -Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol 1994; 11:586:92.
- 28 Knickelbein RG, Ingbar DH, Seres T, Snow K, Johnston RB Jr, Fayemi O, Gumkowski F, Jamieson JD, Warshaw JB. *Hyperoxia enhances expression of γ -glutamyl transpeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung.* Am J Physiol 1996; 270:L115-22.

- 29 Liu RM, Hu H, Robison TW, Forman HJ. *Differential enhancement of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells.* Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:186-91.
- 30 Smith CV, Jones DP, Guenthner TM, Lash LH, Lauterburg BH. *Compartmentation of glutathione: Implications for the study of toxicity and disease.* Toxicol Appl Pharmacol 1996; 140:1-12.
- 31 Schmidt H, Grune T, Müller R, Siems WG, Wauer RR. *Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia.* Pediatr Res 1996; 40:15-20.
- 32 Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. *Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells.* J Biol Chem 1994; 269:26512-7.
- 33 Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W, Smith CAD. *Transcriptional regulation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells.* Biochem Biophys Res Commun 1996; 229:832-7.

- 34 Sosenko IRS, Chen Y, Price LT, Frank L. *Failure of premature rabbits to increase lung antioxidant enzyme activities after hyperoxic exposure: Antioxidant enzyme gene expression and pharmacologic intervention with endotoxin and dexamethasone.* *Pediatr Res* 1995; 37:469-75.
- 35 Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation in human neonatal tissue.* *Free Radical Biol Med* 1994; 16:307-13.
- 36 Hoffman EL, Bennett FC. *Birthweight less than 800 grams: changing outcomes and influences of gender and gestation number.* *Pediatrics* 1990; 86:27-34.
- 37 Pearson E, Bose C, Snidow T, Ransom L, Young T, Bose G, Stiles A. *Trial of vitamin A supplementation in very low birth weight infants at risk for bronchopulmonary dysplasia.* *J Pediatr* 1992; 121:420-7.
- 38 Kera Y, Penttilä KE, Lindros KO. *Glutathione replenishment capacity is lower in isolated perivenous than in periportal hepatocytes.* *Biochem J* 1988; 254:411-7.
- 39 EL yaagoubi M, Visvikis A, Siest G, Wellman M. *Developmental- and tissue-specific DNA methylation patterns and expression of rat gamma-glutamyltransferase.* *Biochem Mol Biol Intern* 1995; 36:257-64.

- 40 Losa GA. *Enzymatic imbalance in peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with Anti-HIV antibodies.* Clin Biochem 1989; 22:321-8.
- 41 Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. *Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides.* Pediatrics 1997; 99:E61-70
- 42 Hill CE, von Hoff DD, Burk RF. *Effect of inhibition of γ -glutamyltranspeptidase by AT-125 (aciciclin) on glutathione and cysteine levels in rat brain and plasma.* Investigational New Drug 1985; 3:31-4.
- 43 Grigg J, Barber A, Silverman M. *Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in intubated premature infants.* Arch Dis Child 1993; 69:49-51.
- 44 Leaf CD, Pace GW. *Development of a novel glutathione repleting agent, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (Procysteine®).* Exp Opin Invest Drugs 1994; 3:1293-302.
- 45 Bjelton L, Fransson GB. *Availability of cysteine and L-2-oxo-thiazolidine-4-carboxylic acid as a source of cysteine in intravenous nutrition.* J Parenter Enter Nutr 1990; 14:177-82.

- 46 Porta P, Aebi S, Summer K, Lauterburg BH. *L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cystein prodrug: pharmacokinetics and effects on thiols in plasma and lymphocytes in human.* J Pharmacol Exp Ther 1991; 257:331-4.
- 47 Meister A. *Selective modification of glutathione metabolism.* Science 1983; 220:472-7.

CHAPITRE 3. DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette thèse confirment que la capacité antioxydante de l'enfant né prématurément est faible parce qu'un des éléments clés de la défense contre les oxydants est abaissé. Certes, d'autres ont aussi démontré que dans le plasma (8), l'érythrocyte (28) et le liquide tapissant les alvéoles pulmonaires (300), les niveaux de glutathion sont plus bas chez les nouveau-nés prématurés. Cependant l'originalité de nos travaux est d'avoir tenté d'expliquer ces observations en vérifiant s'il existait une immaturité enzymatique du système glutathion. L'objectif était d'évaluer la maturation des enzymes responsables du maintien de la concentration intracellulaire de glutathion.

Le présent ouvrage apporte des connaissances nouvelles sur le développement du système glutathion humain, dans certains tissus, durant la période néonatale immédiate, selon l'âge de gestation à la naissance de l'enfant. De plus, ces travaux sont les premiers à démontrer chez l'humain certaines différences entre les genres dans le métabolisme du glutathion. Certes, on ne peut extrapoler les données obtenues de cellules endothéliales de la veine ombilicale et de leucocytes provenant d'aspirats endotrachéaux d'enfants intubés, à d'autres types de cellules ou organes. Cependant, ces trouvailles peuvent fournir des pistes intéressantes d'investigation dans la compréhension des différences de mortalités et de morbidités néonatales entre filles et garçons (303).

Les résultats des travaux sont présentés dans les trois articles formant le corps de la thèse. Ils sont publiés dans: *FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE*. Le champs d'intérêt de celle-ci est en relation avec les radicaux libres et autres oxydants, en médecine et ainsi que dans les systèmes biologiques. Cette revue internationale est le journal officiel de l'*Oxygen Society*.

Quoique la discussion forme un tout, elle est ordonnée en sections. Dans les trois premières, la discussion portera sur les résultats propres à chaque article. À la quatrième section, la pertinence du modèle et des résultats sera abordée. Enfin, le tout se terminera par une conclusion.

3.1 PREMIER ARTICLE

«Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxyde-induced oxidation in human neonatal tissue*. Free Rad Biol Med 1994; 16:307-13.»

À cause de leur immaturité, les nouveau-nés prématurés reçoivent fréquemment par voie intraveineuse des solutions nutritives. Celles-ci contiennent des peroxydes dont la concentration peut atteindre le mM (11). L'hypothèse à vérifier était que l'administration continue de peroxydes perturbe la production veineuse d'eicosanoïdes, suggérant un changement de la capacité antioxydante de la cellule. Le modèle utilisé était celui de la veine du cordon ombilical perfusée avec une solution contenant des quantités de peroxydes telles qu'infusées en

clinique (0,25 et 1 mM). En effet, les solutions de nutrition parentérale reçues par le nouveau-né contiennent fréquemment des concentrations de peroxydes variant entre 0,2 et 1 mM (11). Le choix du cordon ombilical a été justifié par l'accès à du tissu humain. L'analyse des résultats a pris en considération le genre de l'enfant dont originait le cordon ombilical, puisque chez l'animal il a été rapporté que l'activité de certaines enzymes du métabolisme du glutathion était liée au sexe (14).

La synthèse des eicosanoïdes est un beau modèle pour étudier l'état rédox de la cellule. En effet, la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGE_2 requière le GSH comme cofacteur (88) et, contrairement à la thromboxane synthétase, la prostacycline synthétase est inhibée par les radicaux libres (13, 330). Certes, la concentration intracellulaire de GSH (millimolaire) n'est pas limitante pour la formation de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGE_2 (nanomolaire). Se basant sur un temps de demi-vie du glutathion d'environ deux heures, dans l'hépatocyte (125), il est permis de croire qu'une perfusion de la veine ombilicale avec une solution pauvre en substrats mais contenant un peroxyde (le TBH), permette d'abaisser la concentration de GSH dans les cellules endothéliales à un niveau tel que la synthèse de ces deux prostaglandines puisse en être affectée. D'ailleurs, c'est lorsque la concentration intracellulaire de GSH est abaissée que l'utilisation de précurseurs de la synthèse de GSH tels que le N-acétylcystéine et l'acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxylique, entraîne une augmentation de PGE_2 (331, 332) et de GSH (71, 331, 333, 334) dans la cellule.

Les limites et les avantages de ce modèle ont été discuté lors du mémoire de maîtrise. Retenons que, comme suggéré par d'autres (333, 335, 336, 337), la manipulation du cordon suffit pour induire une production accrue de prostaglandines par la veine. Ainsi, sans TBH, la synthèse est maximale au début de la perfusion. La chute rapide qui s'en suit peut s'expliquer par l'auto-inhibition de la synthèse due aux radicaux libres conjointement formés. Cet effet se voit surtout sur la production de prostacycline puisqu'avec ce modèle, la PGI₂ est l'eicosanoïde le plus synthétisé, et celui dont l'enzyme de synthèse est la plus sensible à l'inhibition par les radicaux libres (13, 330). De même, en absence de TBH, la présence de glutathion dans l'éluat aux premiers temps de la perfusion (0,5 et 1,5 h) suggère l'exportation du GSSG formé suite à une activité élevée de la cyclooxygénase, produisant davantage d'oxydants dans la cellules. Il est à noter que la quantité de glutathion dans l'éluat est relativement faible, elle est similaire à celles des eicosanoïdes mesurés, soit de l'ordre du nanomolaire. L'utilisation de deux segments adjacents, un étant le témoin (sans TBH) de l'autre (avec TBH), permet de faire une analyse appariée des résultats, éliminant ainsi la variabilité de la production des eicosanoïdes durant la perfusion qui est intrinsèque au modèle.

Les résultats du premier article ont confirmé l'hypothèse que la perfusion de TBH affecte la synthèse de différents eicosanoïdes (FIGURES 2 et 3 de la section 2.1 aux pages 100 et 101). Les données suggèrent une modulation différente du métabolisme du glutathion selon le genre.

Dans la cellule, la réduction du peroxyde en alcool est catalysée par la GPx qui produit ainsi le GSSG. Afin de maintenir le potentiel rédox de la cellule, le GSSG est recyclé par la GSSG-R en GSH. Si la GPx est plus active que la GSSG-R, le GSSG accumulé sera activement exporté (89, 90, 93, 94, 95, 97). Cependant, la faible quantité de glutathion dans l'éluat des veines perfusées avec la solution témoin, du même ordre de grandeur que les eicosanoïdes mesurés, suggère davantage une perte de glutathion en relation avec l'action de la cyclooxygénase plutôt qu'une activité insuffisante de la GSSG-R. En effet, le patron de la chute de glutathion dans l'éluat est similaire à celui de la production des prostaglandines.

La différence liée au genre entre les niveaux de glutathion dans l'éluat, en présence de TBH, n'apparaît qu'à 0,5 et 1,5 h de perfusion. Les faibles niveaux de glutathion à 2,5 et 3,5 h ne permettent pas d'évaluer si cette différence tient encore. L'absence de glutathion dans l'éluat après 2,5 et 3,5 h de perfusion ne signifie pas que le niveau cellulaire soit davantage abaissé. En effet, si le glutathion joue un rôle sur la synthèse des eicosanoïdes, une modification importante du niveau de glutathion intracellulaire devrait se répercuter sur les taux des eicosanoïdes. Chez le garçon, à l'exception du $\text{PGF}_{2\alpha}$ et du TxB_2 à 0,5 h, les niveaux d'eicosanoïdes étaient stables durant toutes la perfusion. La hausse de glutathion dans l'éluat de garçon à 0,5 h de perfusion avec TBH correspond à une plus grande synthèse du TxB_2 . Ceci peut être expliqué par une baisse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ à ce temps. La baisse en valeur absolue est d'environ $0,6 \mu\text{g/L}$ et

l'augmentation du TxB_2 est d'environ $0,6 \mu\text{g/L}$. Puisque leur production passe par un précurseur commun, PGH_2 , l'inhibition de l'un peut entraîner l'augmentation de l'autre. La synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nécessite deux molécules de GSH. Si la chute du glutathion intracellulaire à ce temps est responsable de l'inhibition de la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$, alors on peut constater que le système s'est bien stabilisé par la suite.

Au contraire, chez la fillette, la perfusion avec 1 mM TBH a entraîné une augmentation des prostaglandines sensibles au statut oxydant dans la cellule. Puisque PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$ requièrent du GSH pour leur synthèse et que celui-ci peut protéger la prostacyclin synthétase d'une attaque radicalaire, ces résultats suggèrent que la perfusion avec 1 mM TBH accroît la concentration intracellulaire de GSH. À une concentration de $0,25 \text{ mM TBH}$, l'augmentation du TxB_2 jumelée à une chute du $\text{PGF}_{2\alpha}$ est similaire à ce qui est observé chez le garçon, à la différence que ceci dure tout le temps de la perfusion. La stimulation de la production de prostaglandines jumelée à l'absence d'effet du TBH sur la relâche de glutathion, suggère une activation de la GSSG-R. Une plus grande activité de la GSSG-R devrait se traduire en un niveau plus élevé de glutathion réduit dans la cellule de la fillette. Puisque l'augmentation de PGI_2 et PGE_2 a été observée à partir de $0,5 \text{ h}$ de perfusion, cette possible élévation d'activité de la GSSG-R a pu avoir lieu tôt; ceci apporterait une explication pour l'absence d'effet du TBH sur la relâche de glutathion dans l'éluat.

L'augmentation de la production de prostaglandines chez la fille

n'était pas proportionnelle au stimulus oxydant. Ceci suggère que durant la période néonatale, un niveau critique d'oxydants est nécessaire pour activer la GSSG-R et que ce phénomène est présent chez la fillette. L'observation de l'augmentation seulement chez la fillette n'exclut pas la possibilité d'obtenir une réponse similaire chez le garçon avec un niveau différent d'oxydants. Un corollaire à nos observations est que, face à un stimulus oxydant donné, la quantité de glutathion intracellulaire devrait être différente entre fille et garçon. Mais attention, ce changement dans la concentration de GSH peut être faible, probablement de l'ordre du nanomolaire. La vérification de ces hypothèses fut l'objet du second article.

3.2 DEUXIÈME ARTICLE

«Lavoie JC, Chessex P. *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues.* Free Rad Biol Med 1997; 23:648-57.»

L'hypothèse de ce deuxième article était qu'un niveau critique d'oxydants est nécessaire pour activer la GSSG-R et que ce phénomène se produit chez la fillette. La validité de cette hypothèse a été vérifiée à l'aide de cellules endothéliales de la veine ombilicale d'enfants nés à terme et partiellement vérifiée dans des cellules d'aspirats endotrachéaux de nouveau-nés ventilés. Afin de confirmer cette hypothèse, l'effet d'un oxydant sur la concentration cellulaire de glutathion a été recherché dans

les leucocytes d'aspirats.

Dans l'article précédent, la différence maximale entre les genres était observé après 2,5 h de perfusion avec 1 mM TBH. Seuls les tissus provenant de fillettes présentaient une augmentation de synthèse des prostaglandines sensibles au statut oxydant dans la cellule. Cependant, à 0,5 et 1,5 h de perfusion il y avait une différence liée aux genres en regard de la présence de glutathion dans l'éluat de la veine. Mais puisque l'hypothèse concernant la GSSG-R était fondée sur les observations liées à la formation des eicosanoïdes, les temps d'incubations de 3 et 4 heures avec 1 mM TBH ont été choisis.

Le modèle de la veine du cordon ombilical, similaire à celui utilisé lors du premier article, a permis de vérifier la spécificité de la réponse liée au genre (FIGURE 1 de la section 2.2, page 129), tandis que l'utilisation des cellules endothéliales de la veine ombilicale en culture a confirmé la nécessité d'un niveau critique d'oxydants pour obtenir l'augmentation d'activité de la GSSG-R (FIGURE 3 de la section 2.2, page 131).

La cause de l'augmentation d'activité de la GSSG-R peut être de deux ordres: soit une activation de l'enzyme, par exemple en enlevant un inhibiteur, soit une quantité plus grande d'enzymes. Je n'ai aucune donnée pouvant supporter l'une ou l'autre de ces spéculations. Cependant, l'hypothèse d'une induction génique est séduisante à cause de ce qui suit.

Il est bien connu que le statut rédox de la cellule peut moduler

l'expression génique par une interaction avec des facteurs de transcriptions tels que le NF κ B et l'AP-1 (1, 338). La forme inactive du facteur nucléaire κ B est présente dans le cytoplasme liée à la protéine inhibitrice I κ B (339, 340, 341). La dissociation entre NF κ B et I κ B est nécessaire pour la translocation du NF κ B au noyau (339, 340, 341), et permettre ainsi la transcription de gènes. Cette dissociation est due à l'action d'une ou des protéases sur I κ B (339). Henkel *et al* rapporte que le GSH inhibe l'activation de NF κ B en inhibant la dissociation (339). D'un autre côté, l'addition de peroxydes à des cellules dont le contenu en GSH avait été préalablement abaissé a induit l'expression des composantes c-fos et c-jun du facteur AP-1 (339, 342, 343). D'autres ont aussi montré que ce facteur permet la transcription du gène codant pour la protéase CANP (344).

De ces données de la littérature, nous pouvons extrapoler qu'en présence d'un oxydant, une chute de la concentration intracellulaire de GSH pourrait induire l'expression d'une protéase nécessaire pour la translocation de NF κ B au noyau. Dans les cellules procaryotes, le facteur oxyR est responsable de l'expression du gène codant pour la GSSG-R (345). OxyR, comme pour NF κ B, est activé par les peroxydes (345, 346).

Un mécanisme hypothétique pouvant expliquer nos résultats, serait qu'en présence d'un oxydant, une chute du ratio GSH/GSSG dans la cellule provoquerait une augmentation de l'expression du gène codant pour GSSG-R. Dans une seconde étape, une plus haute activité de la réductase conduirait à l'élévation du ratio GSH/GSSG,

et à la cessation de l'expression du gène. Ainsi, un niveau critique d'oxydants (concentration de TBH x le temps de contact) serait nécessaire pour modifier momentanément le ratio GSH/GSSG. Un tel mécanisme n'a peut-être pas lieu dans le tissu provenant de garçon parce que celui-ci maintient son ratio rédox en exportant le GSSG formé.

Une différence liée au genre dans l'activation de NF_κB est supportée par l'observation d'une plus haute concentration de IL-1ra, l'antagoniste du récepteur de l'interleukine IL-1 β , dans le liquide amniotique et l'urine de fillettes de moins de 48 heures de vie comparativement au garçon (347). Une résultante de l'action d'IL-1 β est l'augmentation des taux d'ARNm codant pour I_κB (communication personnelle du Docteur Florence Doualla-Bell du Lady Davis Institute).

Parmi les néonatalogistes, on pense qu'il y a une différence de maturation entre filles et garçons en faveur des filles. Ceci est basé sur certaines observations suggérant que la production de surfactant pulmonaire mature plus rapidement chez la fillette (348). Suivant ce mode de pensée, on s'est demandé si la stimulation de l'activité de la GSSG-R pourrait également être un phénomène relié à la maturité du nouveau-né. D'où l'intérêt de rechercher à partir de quel âge de gestation les tissus provenant des filles avaient une réponse différente de ceux des garçons.

Afin de répondre à cette question, des cellules provenant d'aspirats endotrachéaux d'enfants de différents âges de gestation furent utilisées. Cette source de cellules était éthiquement et

cliniquement accessible. De plus, elles provenaient d'un environnement oxydant puisque les enfants recevaient un supplément d'oxygène. L'utilisation de ce tissu a permis d'analyser l'effet de l'âge de gestation, de l'âge postnatal et du genre.

Les données recueillies indiquent que l'activité de la GSSG-R était influencée par l'âge de gestation et l'âge postnatal, tout en présentant une différence d'activité liée au sexe (TABLEAU 1 et FIGURE 4 de la section 2.2, pages 127 et 132). À un jour de vie, l'âge de gestation expliquait significativement ($p < 0,05$) 29% de la variation de l'activité de la GSSG-R tandis qu'après deux jours de vie, seules les cellules provenant de garçons présentaient encore cet effet ($r^2 = 0,37$, $p < 0,05$). Dans les leucocytes d'aspirats, il y a donc une maturation de l'activité de l'enzyme au cours de la gestation, et cela autant chez la fille que chez le garçon. La différence d'activité entre les genres était mise en évidence par l'âge postnatal. L'activité de la GSSG-R du groupe des 26-28 semaines de gestation rejoignait celle du groupe à terme après deux jours seulement chez la fille et 6 jours chez le garçon. Ceci ne doit pas être interprété comme un écart de 4 jours dans la maturité de l'enzyme entre les genres, car les jours 3 à 5 après la naissance n'ont pas été étudiés. Les cellules provenant de fillettes atteignent plus rapidement une activité maximale (FIGURE 4 de la section 2.2, page 132). L'évolution de l'activité de la GSSG-R dans les premières heures de vie pour chaque enfant, en analyse appariée, serait intéressante. Malheureusement, le protocole expérimental n'a pas été conçu à cette fin.

La différence d'activité de la GSSG-R liée au genre n'était pas détectable dans les cellules endothéliales à l'état basal, elle était observable seulement dans un milieu oxydant (FIGURES 1 et 3 de la section 2.2 aux pages 129 et 131). Ces résultats associés au fait qu'une hyperoxie stimule l'activité de la GSSG-R pulmonaire chez le rat nouveau-né en 2 à 6 jours (285, 286), suggèrent que la maturation de l'activité de cette enzyme durant la vie postnatale est induite par un environnement oxydant tel l'oxygène de l'air. Ceci est supporté par le concept mis de l'avant par Lee Frank (349) pour expliquer l'induction des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) en fin de gestation. Ce dernier démontre qu'avec l'activation du métabolisme, il y a formation accrue de radicaux libres. Ceux-ci induiraient les enzymes antioxydantes en préparation au choc oxydatif de la naissance, lorsque le foetus est précipité dans un milieu plus riche en oxygène.

Selon l'activité de la GSSG-R, on devrait trouver une influence du genre sur le contenu intracellulaire en glutathion. En effet, le genre et l'âge de gestation ont influencé la concentration de glutathion dans les cellules d'aspirats endotrachéaux (FIGURE 5 de la section 2.2 à la page 133). Les niveaux étaient plus élevés chez les filles indépendamment de l'âge de gestation.

À fin de comparaison, le taux de glutathion a aussi été mesuré dans des leucocytes provenant de sang circulant. L'écart entre la concentration de glutathion mesurée dans les leucocytes d'aspirats et celle observée dans les leucocytes provenant de sang

de cordons d'enfants nés à terme était important. Par exemple: à 26-28 semaines cet écart était de 10 à 12 fois; à 32-34 semaines il était de 7 fois; à 38-41 semaines il était de 4 à 6 fois. Ces résultats confirment l'immaturité du système antioxydant-glutathion chez les enfants nés prématurément, et suggèrent que même les enfants nés à terme avaient une difficulté à maintenir leur glutathion intracellulaire lorsque l'environnement est pro-oxydant. Une perte de 80 à 90 % du glutathion intracellulaire est considérée comme étant un plancher en-dessous duquel il ne faut pas passer (54). Des leucocytes d'aspirats endotrachéaux d'enfants non intubés aurait pu servir de témoin pour l'effet de l'hyperoxie sur ces faibles concentrations de glutathion. Malheureusement il était impossible pour des raisons éthiques d'obtenir ces témoins. Cependant, l'analyse statistique tenait compte de l'apport en oxygène reçu par les enfants. Les taux de glutathion mesurés dans les cellules d'aspirats d'enfants recevant une FiO_2 inférieure à 0,3 ne différaient pas de ceux d'enfants recevant une FiO_2 supérieure à 0,3. La FiO_2 utilisée pour l'analyse était celle que recevait l'enfant lors de l'aspiration des sécrétions endotrachéales. L'apparente absence d'effet de la FiO_2 peut être expliquée par une variation du taux d'hyperoxie subit par les enfants. En effet, je ne connais pas les taux d'oxygénation qui prévalaient dans l'heure ou les jours précédents les prélèvements. Cependant, dans ces cellules, le taux de synthèse de GSH était significativement corrélé à la FiO_2 , tel que mentionné au troisième article

Afin de connaître l'influence de l'activité de la GSSG-R sur le

contenu cellulaire en glutathion, la recherche d'une corrélation entre ces deux paramètres a été entreprise. Pour des raisons pratiques, la corrélation n'a été mesurée que dans un nombre limité de cellules d'aspirats. Dans celles-ci, les mesures d'activité de la GSSG-R et du contenu en glutathion ont été obtenues pour un même échantillon. La corrélation de ces deux paramètres était significative ($p < 0,01$) et positive dans les cellules provenant de fillettes ($r^2 = 0,36$, $n = 28$) et non chez celles des garçons ($r^2 = 0,02$, $n = 33$). À la lumière des résultats obtenus avec les cellules endothéliales, l'absence d'influence de la GSSG-R sur le glutathion intracellulaire chez le garçon est compréhensive. Ceci peut s'expliquer par l'absence de variation dans l'activité de la GSSG-R dans les cellules provenant de garçons. Cependant, dans les leucocytes d'aspirats, il existe une variation chez le garçon. En effet, l'activité de la GSSG-R croît avec l'âge de gestation durant les deux premiers jours. Puisque ces deux groupes de cellules ne diffèrent pas selon l'âge de gestation (Filles : $34,2 \pm 0,9$; Garçons : $32,6 \pm 0,8$ semaines; t de Student = 1,32) et que la mesure statistique de la variation autour de la moyenne est comparable, il est peu probable que l'absence de corrélation chez le garçon soit due à une homogénéité des activités. Une explication possible est la séparation entre l'enzyme et son substrat. Environ 90 % de l'activité de la GSSG-R et 80-90 % du glutathion cellulaire est dans le cytosol, le restant étant dans le compartiment mitochondrial (125). Ainsi, les faibles niveaux de glutathion observés dans les leucocytes d'aspirats des garçons prématurés peuvent être le reflet du glutathion mitochondrial. Mais ceci reste à être

démontré.

L'activité de la GSSG-R est essentielle à la cellule pour maintenir son glutathion face à l'hyperoxie (350) ou à une charge de H₂O₂ (351). Chez les prématurés d'un jour de vie, l'activité correspondait au tiers de celle mesurée dans les cellules d'enfants nés à terme. La faible activité de la GSSG-R était-elle responsable du niveau abaissé de glutathion? Cette spéculation est supportée par le mode d'action du BCNU, un inhibiteur de la GSSG-R. L'effet inhibiteur du BCNU s'exerce en augmentant le K_m de l'enzyme pour le NADPH de 5 à 35 μM (238). La concentration cellulaire normale de NADPH est d'environ 50 μM (238). Selon l'équation de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

où v est l'activité de l'enzyme,
 V_{max} est l'activité maximum,
 [S] est la concentration du substrat (NADPH),
 K_m est la constante de Michaelis-Menten,

un K_m de 5 μM, est associé à une activité de 0,9 V_{max}, tandis qu'avec un K_m de 35 μM, l'activité diminue du tiers, jusqu'à 0,6 V_{max}. Le BCNU accroît la susceptibilité de la cellule à perdre son glutathion lorsque mise en présence de peroxydes (267). Si une chute d'un tiers de l'activité de la GSSG-R est responsable d'une perte de glutathion, il est alors plausible que dans les leucocytes d'aspirats endotrachéaux, la faible activité enzymatique notée chez les prématurés au premier jour de vie, 2 versus 6 mU/10⁶

cellules à terme (FIGURE 4 de la section 2.2, page 132), entraîne une perte de glutathion. Donc, une concentration plus élevée de glutathion observée dans les cellules provenant des fillettes pourrait être expliquée par l'activité accrue de la GSSG-R.

À six jours de vie, bien que l'activité de la GSSG-R était identique à celle mesurée dans les leucocytes de sang de cordon obtenus d'enfants nés à terme, la concentration cellulaire de GSH demeure basse. Ceci pourrait être expliqué par une synthèse déficiente. En fait, l'âge postnatal n'avait aucun effet significatif sur la concentration cellulaire de glutathion. D'ailleurs, après quatre semaines de vie, des leucocytes d'aspirats endotrachéaux d'enfants nés après 26-27 semaines de gestation avaient un contenu en glutathion similaire à celui mesuré dans les cellules d'enfants d'un jour de vie (TABLEAU 2, section 2.2, page 128). Si la faible activité de la réductase aux premières heures de vie peut être une cause de la perte du glutathion cellulaire, celle-ci ne semblait pas être compensée par une nouvelle synthèse. L'étude de la maturation de la synthèse du GSH fait l'objet de la troisième publication.

3.3 TROISIÈME ARTICLE

«Lavoie JC, Chessex P. *Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants.* Free Rad Biol Med 1998; sous presse.»

La synthèse du glutathion peut être limitée par une faible activité enzymatique ou un faible apport en cystéine. L'objectif de cette article était double : 1) analyser la capacité de synthèse des leucocytes provenant d'aspirats endotrachéaux en fonction du genre, de l'âge de gestation et de l'âge postnatal; et 2) , puisque la concentration intracellulaire de cystéine est une étape limitante pour la synthèse, évaluer l'activité d'une enzyme intervenant dans la disponibilité de cet acide aminé, la γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT).

Le système enzymatique de synthèse du GSH fait intervenir la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCCase) et la glutathion synthétase (GSHase). Selon les constantes cinétiques des deux enzymes, dans une même cellule, la vitesse de réaction de la GSHase doit être l'étape limitante (164). Cependant, selon la biologie cellulaire, la γ -GCCase est partiellement inhibée par le GSH intracellulaire (76, 79, 155). Il suffit d'abaisser la concentration de GSH pour accroître l'activité de la synthèse, ou d'augmenter la quantité d'enzymes pour obtenir une augmentation du contenu en GSH (142, 159), ce qui fait de la γ -GCCase une étape limitante. Puisque le but du travail était de vérifier si la capacité de synthèse de la cellule était responsable des bas niveaux de glutathion observés dans l'article précédent, j'ai choisi de mesurer l'activité globale des deux enzymes. La recherche de la maturité de chaque enzyme aurait été entreprise séparément si une baisse globale de la capacité de synthèse avait été détectée. La méthode utilisée a permis l'évaluation du système γ -GCCase + GSHase à partir des trois acides aminés constituant le GSH. Puisque la concentration de

cystéine utilisée correspondait au Km de la γ -GCCase, celle-ci fonctionnait à 50% de sa vitesse maximale. Ceci ne change en rien les conclusions obtenues.

Les cellules d'aspirats provenaient d'enfants intubés. Les prématurés étaient intubés à cause d'une immaturité pulmonaire tandis que les enfants nés à terme (≥ 38 semaines) l'étaient suite à une opération chirurgicale et une ventilation compromise. Donc, le groupe de cellules provenant d'enfants nés à terme n'était pas un groupe témoin par excellence. C'est pourquoi, les données provenant d'enfants prétermes ont été statistiquement analysées entre elles. Puisqu'un oxydant peut induire une synthèse de γ -GCCase (142, 159), il était intéressant aussi de mesurer la production de GSH dans des cellules provenant d'un milieu non oxydant tel que le sang de cordons ombilicaux.

Les niveaux d'activités étaient négativement corrélés à l'âge de gestation tant pour les leucocytes provenant d'aspirats endotrachéaux (entre 26 et 37 semaines, FIGURE 1 de la section 2.3, page 163) que pour ceux isolés de sang de cordon (TABLEAU 1 de la section 2.3, page 162). Donc, la capacité de ces cellules de synthétiser le GSH n'explique pas les faibles taux en glutathion. Bien au contraire, ces résultats confirment la faible concentration intracellulaire de glutathion. En effet, il est connu qu'une chute de glutathion induit la synthèse de γ -GCCase (142, 159, 352, 353).

Puisque l'activité de synthèse chutait entre 26 et 37 semaines de gestation, on se serait attendu à voir une activité encore plus

basse dans les cellules d'aspirats d'enfants nés à terme. Cependant, chez ces derniers, l'activité était équivalente à celle du groupe des 26-29 semaines. Contrairement au prématurés, ces enfants nés à terme avaient subi une chirurgie. Il était donc légitime de se demander si une intervention chirurgicale aurait pu induire un accroissement de la capacité des leucocytes à synthétiser du GSH. Puisque la littérature est muette sur ce point, il a été vérifié au laboratoire. Dans le cadre d'une étude en nutrition parentérale, l'effet d'une opération chirurgicale sur le métabolisme du glutathion a été investigué. Deux groupes de six cochons d'Indes d'un jour de vie ont été comparés. Un seul groupe a subi une intervention sous kétamine, consistant à dégager la jugulaire, puis à refermer la plaie. Après quatre jours de cohabitation avec leur mère, les animaux ont été sacrifiés et les organes prélevés. L'activité de synthèse du GSH au niveau pulmonaire était augmentée dans le groupe des opérés ($2,2 \pm 0,27$ vs $0,91 \pm 0,36$ nmoles/h/mg de protéine). Il s'agit d'un effet spécifique à l'activité de synthèse puisque les activités de la GSSG-R et de la γ -GT ne différaient pas entre les deux groupes (selon le test de Student, $t < 1,2$). Nous n'avons pas d'explication pour l'effet stimulant de la chirurgie sur la synthèse. Cette observation soulevait la question de l'effet d'une procédure chirurgicale sur les niveaux de glutathion dans les cellules d'aspirats endotrachéaux. Au deuxième article, les taux les plus élevés de glutathion étaient observés dans le groupe des 38-41 semaines de gestation. D'une façon rétrospective, j'ai vérifié pourquoi les enfants de ce groupe avaient été intubés et ventilés.

Huit enfants ont été intubés suite à une chirurgie antérieure, et douze l'ont été pour des raisons d'immaturité pulmonaire. L'effet chirurgie n'était pas significatif ni chez les filles (opérées (n = 3) : 479 ± 67 , non opérées (n = 7) : 429 ± 77 pmoles / 10^6 cellules; t de Student = 0,39) ni chez les garçons (opérés (n = 5) : 339 ± 54 , non opérés (n = 5) : 216 ± 102 pmoles / 10^6 cellules; t de Student = 1,13). La chirurgie n'a pas affectée non plus l'activité de la GSSG-R (t < 0,87).

La somme des observations sur la capacité de synthétiser du GSH suggère que ces cellules réagissent positivement à un environnement oxydant ou à un faible taux de GSH. Elles ont la capacité de produire du glutathion, même chez des enfants nés prématurément. Malgré cela, le contenu en glutathion était bas.

Ces résultats ont conduit à vérifier la maturité de l'activité de la γ -GT. Cette enzyme peut scinder le glutathion circulant en ses acides aminés pour leur incorporation dans la cellule. La cystéine est une étape limitante pour la synthèse du GSH. La cellule peut également utiliser la cyst(é)ine extracellulaire. La γ -GT est responsable de 50% du transport de cet acide aminé dans la cellule (108, 209). Il a été démontré que l'inhibition de la γ -GT causait une chute de la concentration cellulaire de cystéine (109) et de GSH (108). Pour ces raisons, il était légitime de vérifier l'hypothèse d'une immaturité de l'activité de cette enzyme pour expliquer les faibles taux de glutathion observés dans les cellules d'aspirats endotrachéaux.

Dans les leucocytes isolés de sang de cordon, l'activité était plus

basse chez les enfants nés prématurément. Au contraire, dans les cellules d'aspirats endotrachéaux, l'effet de l'âge de gestation n'était pas significatif, seul l'effet de l'âge postnatal l'était (FIGURE 2 de la section 2.3, page 164). Cet accroissement rapide de la γ -GT après la naissance, entre les jours un et six de vie, pouvait éventuellement masquer l'effet de l'âge de gestation observé dans les leucocytes circulants obtenus à zéro jour de vie. Malgré cette augmentation d'activité reliée à l'âge postnatal, les taux de glutathion cellulaire demeurent bas, même après six jours de vie. Ici encore, l'activité de la γ -GT ne semblait pas non plus être une étape limitante de la synthèse de GSH. Les faibles taux de glutathion sont-ils dus à une possible immaturité des transporteurs membranaires de cyst(é)ine? Cela est peu probable car, comme nous l'avons vu plus haut, la γ -GT est responsable d'environ 50% du transport de cet acide aminé (108, 209) et que son activité triple en six jours de vie. La maturité de la synthèse et de la γ -GT associée à une faible concentration plasmatique de cyst(é)ine (132) et de glutathion (8), suggèrent davantage une déficience en substrat chez le prématuré.

Les enfants de l'étude étaient sous nutrition parentérale ne contenant pas de cystéine. Certes, le foie peut transformer la méthionine de la nutrition en cystéine. Cependant, une enzyme de cette cascade, la cystathionase, est immature chez le prématuré (132) et demeure déficiente même chez l'enfant né à terme (131). Il serait intéressant de connaître l'effet du genre sur l'activité de cette enzyme. Une activité accrue de celle-ci chez la fillette aurait pu expliquer les différences de concentration en glutathion lié au

genre. Il aurait été intéressant de connaître les taux de glutathion dans les leucocytes d'aspirats d'enfants nés à terme mais ayant un ou deux mois de vie. Puisque l'activité de la cystathionase augmente après la naissance, une augmentation du niveau de glutathion et/ou la disparition de l'effet genre auraient été un bon indice de l'influence de cette voie métabolique.

3.4 PERTINENCE

Le devenir des enfants nés prématurément représente le sujet de plusieurs études. Un fait commun rapporté par de nombreux auteurs, est la différence de morbidité et de mortalité liée au sexe de l'enfant. Citons quelques exemples. Les garçons nés avant 34 semaines de gestation présentent davantage de désordres neurodéveloppementaux à 2 ans que les filles (354). À 5 ans, l'incidence d'invalidités et d'infirmités est plus élevée chez ces garçons (355). La fréquence du syndrome de détresse respiratoire est plus élevée chez le garçon (304, 305). La viabilité est plus élevée chez les fillettes nées avant 25 semaines de gestation (301, 302, 303).

Avec notre modèle de la veine ombilicale exposé à un oxydant, la viabilité est plus basse chez les cellules endothéliales isolées de cordon de garçons (FIGURE 2 de la section 2.2 à la page 130) suggérant une différence liée au statut antioxydant. Lee Frank (47, 48, 49, 65, 66) a bien démontré l'importance de la défense antioxydante pour la survie à l'hyperoxie («1.7 CAPACITÉ

ANTIOXYDANTE DU NOUVEAU-NÉ»,page 68). À la lumière de ces études, l'observation d'une différence dans le métabolisme du glutathion dans des tissus provenant de garçons et de filles durant la période néonatale soulève des interrogations sur le rôle du glutathion dans l'incidence de morbidité et de mortalité liée à la prématurité.

Une récente étude souligne l'importance d'apporter du glutathion au nouveau-né avant l'exposition à un stimulus oxydant important (356). En effet, au premier jour de vie, des lapereaux nés prématurément ont reçu par voie intrapéritonéale une solution glucosée dans du salin. Cette solution était enrichie ou non de GSH à 1 mM. Ces animaux étaient par la suite exposés à l'air ambiant ou à 95% d'oxygène pour 24 heures. Les lapereaux sous O₂, sans supplément de GSH, ont développé des signes d'injures pulmonaires telles que de l'oedème, une chute de glutathion et de viabilité cellulaire. Les animaux exposés à l'oxygène et recevant du GSH n'étaient pas différents de ceux exposés à l'air ambiant.

Nos études avec le cochon d'Indes d'un jour de vie démontrent que les décès survenant sous hyperoxie sont associés à un niveau plus élevé (133%) de glutathion pulmonaire (communication personnelle). En fait, la survie n'est obtenue que lorsque les niveaux de glutathion atteignent 166% de ceux des animaux témoins. Ceci suggère que pour contrer les effets toxiques de l'hyperoxie il ne suffit pas de maintenir la concentration de glutathion mais bien de l'accroître suffisamment. Puisque la

capacité pulmonaire de synthétiser le GSH est augmentée chez les animaux sous hyperoxie indépendamment de la survie, pour accroître les taux de glutathion à des niveaux permettant la survie, il a suffi de fournir à ces animaux un meilleur apport en substrat.

Il est rapporté qu'en culture cellulaire, dans un milieu non oxydant, tant que le compartiment mitochondrial de glutathion est intact, la cellule survit et est même fonctionnelle (54). Les niveaux de glutathion observés dans les leucocytes isolés d'aspirats endotrachéaux correspondent à environ 10 à 25% du ceux mesurés dans les leucocytes circulants d'enfants nés à terme. Ce qui laisse entrevoir que le compartiment cytosolique de glutathion est bien bas. Comme pour le poumon de cochon d'Indes (communication personnelle), la capacité de ces cellules à synthétiser le GSH croît avec la concentration d'oxygène (FiO_2). Malgré que la capacité de synthèse diminue avec l'accroissement de l'âge de gestation, l'effet combiné de l'âge de gestation et de la FiO_2 influence la variation de la mesure dans une proportion de 42% (page 154). Selon nos études avec le cochon d'Indes, il est permis de croire que les leucocytes d'aspirats ont la machinerie nécessaire pour réagir à l'hyperoxie. Les bas niveaux de glutathion laissent présager une faible capacité à contrer les effets toxiques de l'oxygène. Cependant, on ne sait pas si ces leucocytes sont un reflet de ce qui existe dans les autres cellules pulmonaires.

Les cellules d'aspirats endotrachéaux ont servi de modèle pour

étudier la maturité des enzymes responsables du maintien du glutathion intracellulaire. Ce modèle est valide pour l'étude des activités maximales d'une enzyme en particulier, et des taux de glutathion dans les cellules à un temps donnés. Les résultats obtenus avec ces cellules sont une photographie de la cellule. Il faut être par contre prudent dans l'interprétation des résultats impliquant une cascades d'activités enzymatiques tel que la mesure de la capacité globale de la cellule à synthétiser le glutathion. En effet, les interactions moléculaires à l'intérieure d'une cellule intacte sont différentes de celles au sein d'un lysat de cellules. Face à la morbidité liée à l'hyperoxie néonatale, il aurait été intéressant de connaître l'état de la maturité des enzymes responsables du maintien du glutathion intracellulaire dans un organe tel que le poumon. Dans l'état actuel de nos connaissances, on ne peut pas extrapoler les résultats obtenus dans les leucocytes d'aspirats endotrachéaux aux poumons. Cependant, les bas niveaux de glutathion mesurés dans les leucocytes d'aspirats endotrachéaux d'enfants nés prématurément confirment le faible taux rapporté dans le plasma (8), les érythrocytes (28) et le liquide tapissant les alvéoles pulmonaires (300) d'enfants prématurés.

Puisque l'activité enzymatique est mature, l'observation d'une faible concentration de glutathion dans les cellules d'aspirats de prématurés, même après quatre semaines de vie, pourrait être le reflet d'une déficience en cystéine dans l'organisme en général. L'apparent défaut de substrat pourrait empêcher la cellule de maintenir un niveau optimal de GSH lorsqu'elle est sollicitée par

un environnement oxydant. Une approche nutritionnelle pourrait être envisagée pour corriger cette déficience en substrat et optimiser le statut en glutathion.

Si la variation de concentrations de glutathion, observée dans les leucocytes d'aspirats endotrachéaux, est due à l'âge de gestation, alors nos résultats suggèrent un retard de maturation d'environ un mois chez le garçon (FIGURE 5 de la section 2.2 à la page 133). D'autres ont aussi rapporté une différence de maturation pulmonaire à l'avantage de la fillette. Il s'agissait d'une différence de quelques semaines dans la production du surfactant (348). Dans ce cas, une approche pharmacologique pourrait être envisagée pour assurer un niveau optimal de glutathion.

Lee Frank a démontré que, chez l'animal, l'activité d'enzymes antioxydantes pulmonaires (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) croît avec l'avancement de la gestation. De même, dans notre modèle, les activités de la GSSG-R et de la γ -GT augmentent avec l'âge postconceptionnel. Lee Frank a démontré que l'hyperoxie stimule l'activité de ces enzymes antioxydantes seulement dans les animaux né à terme. Par contre, cette thèse suggère que la stimulation de systèmes enzymatiques impliqués dans la défense antioxydante (la synthèse du GSH et la γ -GT) peuvent aussi se produire chez le prématuré humain à des concentrations d'oxygène aussi basse que celle rencontrée à l'air ambiant.

3.5 CONCLUSION

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme essentielle de la cellule pour contrer les effets nocifs des peroxydes. Cependant, une faible concentration cellulaire de GSH compromet ce pouvoir détoxifiant. Cette enzyme réduit les peroxydes en alcool ou en eau en utilisant le GSH comme agent donneur d'électron. L'affinité de la peroxydase pour les peroxydes est beaucoup plus élevée que pour le glutathion. En effet, le K_m de l'enzyme pour le GSH est de 2 à 4 mM et de 20 à 50 μ M pour les peroxydes (357, 358, 359). La concentration normale de GSH dans la cellule (54) correspond donc au K_m de la glutathion peroxydase pour celui-ci. Le fait d'abaisser le niveau de glutathion sous la valeur du K_m réduira donc l'activité de la peroxydase. Ainsi, un apport constant de peroxydes exogènes (11) associé à une faible concentration cellulaire de glutathion risque de faire pencher dangereusement la balance vers la pathologie. Ceci est d'autant plus inquiétant que l'activité de la GPx plasmatique est connue comme étant faible chez les enfants nés avant 32 semaines de gestation (360). Cependant, il n'existe pas à ma connaissance d'étude clinique corrélant l'effet d'une charge exogène ou d'une stimulation endogène de la génération de peroxydes sur le devenir des nouveau-nés.

Les résultats présentés dans la thèse suggèrent que, rapidement après la naissance, l'apport d'une source de substrat pour la synthèse de glutathion pourrait être bénéfique à l'enfant né prématurément. Cependant, l'ajout de cystéine à la nutrition

parentérale est problématique. La cystéine s'oxyde facilement pour devenir le disulfure cystine, insoluble. De plus, la cystéine réagit avec le glucose, une composante de la nutrition parentérale, pour former le composé glucose-cystéine (361). La N-acétylcystéine pourrait être une source de cystéine plus stable. Cependant, il reste à démontrer que le système de transport de cet acide aminé dans la cellule est adéquat chez le prématuré. Une alternative serait de donner un précurseur de la cystéine tel que l'acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxylique (OTC) (107) ou le glutathion lui-même. L'OTC ne s'oxyde pas, est soluble et entre librement dans la cellule où l'action de la 5-oxo-prolinase le transforme en cystéine, tandis que le glutathion peut être utilisé par la γ -GT puisque l'activité de celle-ci croît rapidement durant la période néonatale. Cependant, il reste à démontrer, dans une étude clinique, la pertinence d'optimiser les niveaux intracellulaires de glutathion sur le devenir des prématurés.

CHAPITRE 4. BIBLIOGRAPHIE

- 1 Sun Y, Oberley LW. *Redox regulation of transcriptional activators*. Free Rad Biol Med 1996; 21:335-48.
- 2 Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. *Oxidants as stimulators of signal transduction*. Free Rad Biol Med 1997; 22:269-85.
- 3 Monteiro HP, Stern A. *Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways*. Free Rad Biol Med 1996, 21:323-33.
- 4 Allen RG, Balin AK. *Oxidative influence on development and differentiation: An overview of a free radical theory of development*. Free Rad Biol Med 1989; 6:631-61.
- 5 Poli G, Parola M. *Oxidative damage and fibrogenesis*. Free Radical Biol Med 1997; 22:287-305.
- 6 Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals and antioxidant protection: Mechanisms and significance in toxicology and disease*. Human Toxicol 1988; 7:7-13.
- 7 Halliwell B. *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* Lancet 1994; 344:721-4.
- 8 Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. *Compartmentation of glutathione: Implications for the study of toxicity and disease*. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 140:1-12.

- 9 Freeman BA, Crapo JD. *Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria.* J Biol Chem 1981; 256:10986-92.
- 10 Heffner JE, Repine JE. *Pulmonary strategies of antioxidant defense.* Am Rev Respir Dis 1989; 140:531-54.
- 11 Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. *Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides.* Pediatrics 1997; 99:E61-70.
- 12 Lavoie JC, Chessex P. *The increase in vasomotor tone induced by a parenteral lipid emulsion is linked to an inhibition of prostacyclin production.* Free Rad Biol Med 1994; 16:795-9.
- 13 Lavoie JC, Chessex P. *Biological effects of parenteral bisulfite on human vascular tissue.* Pediatr Res 1993; 33:347-51.
- 14 Rikans LE, Moore DR. *Influence of aging on rat liver enzymes involved in glutathione synthesis and degradation.* Arch Gerontol Geriatr 1991; 13:263-70.
- 15 Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. *Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now?* J Lab Clin Med 1992; 119:598-620.
- 16 Frankel EN. *Lipid oxidation.* Prog Lipid Res 1980; 19:1-2.

- 17 Gardner HW. *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic Biol Med 1989; 7:65-86.
- 18 Rice-Evans C, Burton R. *Free radical-lipid interactions and their pathological consequences*. Prog Lipid Res 1993; 32:71-110.
- 19 Tappel AL. *Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation*. Annals New York Academy of Sciences 1980:18-31.
- 20 Yamauchi R, Matsui T, Kato K, Ueno Y. *Reaction products of α -tocopherol with methyl linoleate-peroxyl radicals*. Lipids 1990; 25:152-8.
- 21 Porter NE, Cladwell SE, Mills KA. *Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids*. Lipids 1995; 30:277-90.
- 22 Sevanian A, Hochstein P. *Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems*. Ann Rev Nut 1985; 5:365-90.
- 23 Gutteridge JMC, Halliwell B. *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems*. Trends Biochem Sci 1990; 15:129-35.

- 24 D'Armiento FP, Di Gregorio F, Ciafre SA, Posca T, Liguori A, Napoli C, Colasanti P, Cali A, Vecchione R. *Histological findings and evidence of lipid conjugated dienes and malonyldialdehyde in human fetal aortas.* Acta Paediatr Scand 1993; 82:823-8.
- 25 Jeejeebhoy KN. *In vivo breath alkane as an index of lipid peroxidation.* Free Radic Biol Med 1991; 10:191-3.
- 26 Fujita M, Sano M, Yoshino K, Tomita I. *Effects of aldehyde dehydrogenase and glutathione on the degradation of (E)-4-hydroxy-2-nonenal and N-hexanal in rat liver.* Biochem Mol Biol Int 1994; 32:429-34.
- 27 Montgomery JA, Jetté M, Huot S, Des Rosiers C. *Acyloin production from aldehydes in the perfused rat heart: The potential role of pyruvate dehydrogenase.* J Biochem 1993; 294:727-33.
- 28 Schmidt H, Grune T, Müller R, Siems WG, Wauer RR. *Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia.* Paediatr Res 1996; 40:15-20.
- 29 Goldring C, Casini AF, Maellaro E, Del Bello B, Comporti M. *Determination of 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* Lipids 1993; 28:141-5.

- 30 Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. *Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography.* Anal Biochem 1991; 197:277-83.
- 31 Janero DR. *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.* Free Rad Biol Med 1990; 9:515-40.
- 32 Pavord ID, Wisniewski A, Mathur R, Wahedna I, Knox AJ, Tattersfield AE. *Effect of inhaled prostaglandin E2 on bronchial reactivity to sodium metabisulfite and methacholine in patients with asthma.* Thorax 1991; 46:633-7.
- 33 Spitz DR, Sullivan SJ, Malcolm RR, Roberts RJ. *Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal.* Free Rad Biol Med 1991; 11:415-23.
- 34 Ohya T. *Reactivity of alkanals towards malondialdehyde (MDA) and the effect of alkanals on MDA determination with a thiobarbituric acid test.* Biol Pharm Bull 1993; 16:1078-82.
- 35 Palamanda JR, Kehrer JP. *Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes.* Arch Biochem Biophys 1992; 293:103-9.

- 36 Szweda LI, Uchida K, Tsai L, Stadtman ER. *Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine.* J Biol Chem 1993; 268:3342-7.
- 37 Chojkier M, Houghlum K, Solis-Herruzo J, Brenner D. *Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation?* J Biol Chem 1989; 264:16957-62.
- 38 Parola M., Pinzani M., Casini A., Albano E., Poli G., Gentilini A., Dianzani M.U. *Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen a 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells.* Biochem Biophys Res Commun 1993; 194:1044-50.
- 39 Gurtner GH, Michael JR, Farrukh I, Sciuto AM, Adkinson NF. *Mechanism of hyperoxia-induced pulmonary vascular paralysis: effect of antioxidant pretreatment.* J Appl Physiol 1985; 59:953-8.
- 40 Lavoie JC, Chessex P. *Gender-related response to a tert-butylhydroperoxide-induced oxidation in human neonatal tissue.* Free Rad Biol Med 1994; 16:307-14.
- 41 Yoshinura Y, Matsuzaki Y, Watanabe T, Uchiyama K, Ohsawa K, Imaeda K. *Effects of buffer solutions and chelators on the generation of hydroxyl radical and the lipid peroxidation in the Fenton reaction system.* J Clin Biochem Nutr 1992; 13:147-54.

- 42 Gutteridge JMC. *Superoxide- dependent formation of hydroxyl radicals from ferric-complexes and hydrogen peroxide: an evaluation of fourteen iron chelators.* Free Rad Res Comm 1990; 9:119-25.
- 43 Gutteridge JMC. *Inhibition of the fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities.* Chem Biol Interactions 1985; 56:113-20.
- 44 Koppenol WH. *The centennial of the Fenton reaction.* Free Radical Biol Med 1993; 15:645-51.
- 45 Van der Zee J, Krootjes BBH, Chignell CF, Dubbelman TMAR, Van Steveninck J. *Hydroxyl radical generation by a light-dependent Fenton reaction.* Free Radical Biol Med 1993; 14:105-13.
- 46 Freeman BA., Crapo JD. *Biology of disease, free radicals and tissue injury.* Lab Invest 1982;47:412-26.
- 47 Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:7915-22.
- 48 Frank L, Sosenko IRS. *Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species.* J Pediatr 1987; 110:106-10.

- 49 Frank L. *Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity*. Free Rad Biol Med 1991; 11:463-94.
- 50 Frank L, Sosenko IRS. *Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: Possible implications for the prematurely born infant*. J Pediatr 1987; 110:9-14.
- 51 Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L. *Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees*. Plant Physiol 1995; 109:1047-57.
- 52 Bélanger S, Lavoie JC, Chessex P. *Influence of bilirubine on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants*. Biol Neonate 1997; 71:233-8.
- 53 Richie Jr JP, Skowronski L, Abraham P, Leutzinger Y. *Blood glutathione concentrations in a large-scale human study*. Clin Chem 1996; 42:64-70.
- 54 Uhlig S, Wendel A. *The physiological consequences of glutathione variations*. Life Sci 1992; 51:1083-94.
- 55 Travis J. *Oxidants and antioxidants in the lung*. Am Rev Resp Dis 1987; 135:773-4.
- 56 Shan X, Aw TY, Jones DP. *Glutathione-dependent protection against oxidative injury*. Pharmac Ther 1990; 47:61-71.

- 57 Constantinescu A, Han D, Packer L. *Vitamine E recycling in human erythrocyte membranes.* J Biol Chem 1993; 268:10906-13.
- 58 Chow CK. *Vitamin E and oxidative stress.* Free Radical Biol Med 1991; 11:215-32.
- 59 May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE. *Ascorbate recycling in human erythrocytes: Role of GSH in reducing dehydroascorbate.* Free Rad Biol Med 1996; 20:543-51.
- 60 Xu DP, Washburn MP, Sun GP, Wells WW. *Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes.* Biochem Biophys Res Commun 1996; 221:117-21.
- 61 Winterbourn CC, Metodiewa D. *The reaction of superoxide with reduced glutathione..* Arch Biochem Biophys 1994; 314:284-90.
- 62 Reed DJ. *Regulation of reductive processes by glutathione.* Biochem Pharmacol 1986; 35:7-13.
- 63 Eaton JW. *Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary.* J Lab Clin Med 1991; 118:3-4.
- 64 Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Sugimoto T, Razandi M, Ivey KJ. *Antioxidant defenses of cultures gastric cells against oxygen metabolites: role of GSH redox cycle and endogenous catalase.* Am J Physiol 1991; 261:G921-8.

- 65 Suttorp N, Toepper W, Roka L. *Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase*. Am J Physiol 1986; 251:C671-80.
- 66 Ondarza RN, Rendon JL, Ondarza M. *Glutathione reductase in evolution*. J Mol Evol 1983; 19:371-5.
- 67 Fahey RC, Sundquist AR. *Evolution of glutathione metabolism*. In: Advances in enzymology and related areas of molecular biology; John Wiley & Sons, Inc; Ed. A. Meister 1991; 64:1-53
- 68 de Rey-Pailhade J. *Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid*. Compt Rend 1888; 106:1683-4.
- 69 de Rey-Pailhade J. *Nouvelles recherches physiologiques sur la substance organique hydrogénant le soufre à froid*. Compt Rend 1888; 107:43-4.
- 70 Hopkins FG. *On an autoxidisable constituent of the cell*. Biochem J 1921; 15:286-305.
- 71 Meister A. *Selective modification of glutathione metabolism*. Science 1983; 220:472-7.
- 72 Huang CS, He W, Meister A, Anderson ME. *Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:1232-6.

- 73 Meister A. *New aspects of glutathione biochemistry and transport - Selective alteration of glutathione metabolism.* Nutrition Reviews 1984; 24:397-410.
- 74 Meister A, Anderson ME. *Glutathione.* Ann Rev Biochem 1983; 52:711-60.
- 75 Meister A. *New development in glutathione metabolism and their potential application in therapy.* Hepatology 1984; 4:739-42.
- 76 Meister A. *New aspects of glutathione biochemistry and transport. - Selective alteration of glutathione metabolism.* Nutrition Reviews 1984; 42:397-410.
- 77 Meister A. *Function of glutathione in kidney via the γ -glutamyl cycle.* Medical Clinics of North America 1975; 1:649-666.
- 78 Meister A. *On the enzymology of amino acid transport. Transport in kidney and probably other tissues is mediated by a cycle enzymatic reactions involving glutathione.* Science 1973; 180:33-9.
- 79 Meister A, Griffith OW, Novogrodsky A, Tate SS. *New aspects of glutathione metabolism and translocation on mammals.* Excerpta Medica 1980; Sulphur in biology (Ciba foundation symposium 72):135-61.

- 80 Habib GM, Barrios R, Shi ZZ, Lieberman MW. *Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with γ -glutamyl transpeptidase.* J Biol Chem 1996; 271:16273-80.
- 81 Hinchman CA, Ballotori N. *Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process..* J Toxicology and Environmental Health 1994; 41:387-409.
- 82 van Bladeren PJ, van Ommen B. *The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits.* Pharmac Ther 1991; 51:35-46.
- 83 Black SM, Wolf CR. *The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance.* Pharmac Ther 1991; 51:139-54.
- 84 Armstrong RN. *Glutathione S-transferases: Reaction mechanism, structure, and function.* Chem Res Toxicol 1991; 4:131-40.
- 85 Coles B, Ketterer B. *The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis.* CRC Crit Rev Biochem Mol Biol 1990; 25:47-70.
- 86 Tsuchida S, Sato K. *Glutathione transferases and cancer.* CRC Crit Rev Biochem Mol Biol 1992; 27:337-84.

- 87 Igarashi T, Satoh T. *Sex and species differences in glutathione S-transferase activities.* Drug Metab Drug Interact 1989; 7:191-212.
- 88 Ujihara M, Tsuchida S, Satoh K, Sato K, Urade Y. *Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin D₂, E₂, and F_{2α}, formation from prostaglandin H₂ by various rat glutathione S-transferase isozymes.* Arch Biochem Biophys 1988; 264:428-37.
- 89 Ozaki M, Aoki S, Masuda Y. *K⁺-linked release of oxidized glutathione induced by tert-butyl hydroperoxide in perfused rat liver is independent of lipid peroxidation and cell death.* Jpn J Pharmacol 1994; 65:183-91.
- 90 Srivastava SK, Beutler E. *The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate.* Biochem J 1969; 114:833-7.
- 91 Srivastava SK, Awasthi YC, Beutler E. *Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes.* Biochem J 1974; 139:289-95.
- 92 Srivastava SK, Beutler E. *Cataract produced by tyrosinase and tyrosine systems in rabbit lens in vitro.* Biochem J 1969; 112:421-5.

- 93 Ishikawa T, Sies H. *Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism.* J Biol Chem 1984; 259: 3.
- 94 Sies H, Gerstenecker CH, Menzel H, Flohé L. *Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.* FEBS Lett 1972; 27:171-5.
- 95 Akerboom TPM, Bilzer M, Sies H. *The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver.* J Biol Chem 1982; 257:4248-52.
- 96 Kondo T, Dale GL, Beutler E. *Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes.* Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:6359-62.
- 97 Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell JR. *Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: Regulation and response to oxidative stress.* J Pharm Exp Ther 1983; 227:749-54.
- 98 Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. *Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover.* Hepatology 1984; 4:586-90.

- 99 Rosemeyer MA. *The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase.* Cell Biochemistry and function 1987; 5:79-95.
- 100 Hanukoglu I, Rapoport R. *Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria.* Endocr Res 1995; 21:231-41.
- 101 Ramirez R, Rasschaert J, Sener A, Malaisse WJ. *The coupling of metabolic to secretory events in pancreatic islets. Glucose-induced changes in mitochondrial redox state.* Biochim Biophys Acta 1996; 1273:263-7.
- 102 DeLeve LD, Kaplowitz N. *Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity.* Pharmac Ther 1991; 52: 287-305.
- 103 Smith JE. *Relationship of in vivo erythrocyte glutathione flux to the oxidized glutathione transport system.* J Lab Clin Med 1974; 83:444-50.
- 104 Visarius TM, Putt DA, Schare JM, Pegouske DM, Lash LH. *Pathways of glutathione metabolism and transport in isolated proximal tubular cells from rat kidney.* Biochem Pharmacol 1996; 52:259-72.
- 105 Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SPC, Deeley RG. *ATP-dependent glutathione disulfide transport mediated by the MPR gene-encoded conjugate export pump.* Biochem J 1996; 314:433-7.

- 106 Deneke SM, Fanburg BL. *Regulation of cellular glutathione*. Am J Physiol 1989; 257:L163-73.
- 107 Anderson ME. *Glutathione and glutathione delivery compounds*. Advances in Pharmacol 1997; 38:65-78.
- 108 Cotgreave IA, Schuppe-Koistinen I. *A role for γ -glutamyl transpeptidase in the transport of cystine into human endothelial cells: relationship to intracellular glutathione*. Biochim Biophys Acta 1994; 1222:375-82.
- 109 Hill CE, Von Hoff DD, Burk RF. *Effect of inhibition of γ -glutamyltranspeptidase by AT-125 (acivicin) on glutathione and cysteine levels in rat brain and plasma*. Investigational New Drug 1985; 3:31-4.
- 110 Witschi A, Junker E, Schranz C, Speck RF, Lauterburg BH. *Supplementation of N-acetylcysteine fails to increase glutathione in lymphocytes and plasma of patients with AIDS*. AIDS Research And Human Retroviruses 1995; 11:141-3.
- 111 Michelet F, Gueguen R, Leroy P, Wellman M, Nicolas A, Siest G. *Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: Relation to sex, aging, biological variables, and life habits*. Clin Chem 1995; 41:1509-17.
- 112 Vore M. *Canalicular transport: Discovery of ATP-dependent mechanisms*. Toxicol Appl Pharmacol 1993; 118:2-7.

- 113 Lu SC, Kuhlenkamp J, Ge JL, Sun WM, Kaplowitz N. *Specificity and directionality of thiol effects on sinusoidal glutathione transport in rat liver.* Mol Pharmacol 1994; 46:578-85.
- 114 Kannan R, Kuhlenkamp JF, Jeandidier E, Trinh H, Ookhtens M, Kaplowitz N. *Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat.* J Clin Invest 1990; 85:2009-13.
- 115 Kannan R, Yi JR, Tang D, Li Y, Zlokovic BV, Kaplowitz N. *Evidence for the existence of a sodium-dependent glutathione (GSH) transporter. Expression of bovine brain capillary mRNA and size fractions in Xenopus laevis oocytes and dissociation from γ -glutamyltranspeptidase and facilitative GSH transporters.* J Biol Chem 1996; 271:9754-8.
- 116 Hagen TM, Jones DP. *Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat.* Am J Physiol 1987; 252:G607-13.
- 117 Sagara JI, Makino N, Bannai S. *Glutathione efflux from cultured astrocytes.* J Neurochem 1996; 66:1876-81.
- 118 Bai C, Brown LAS, Jones DP. *Glutathione transport by type II cells in perfused rat lung.* Am J Phys 1994; 267:L447-55.

- 119 Brown LAS, Bai C, Jones DP. *Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits.* Am J Physiol 1992; 262:L305-12.
- 120 Lu SC, Sun WM, Yi J, Ookhtens M, Sze G, Kaplowitz N. *Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells.* J Clin Invest 1996; 97:1488-96.
- 121 Deneke SM, Susanto I, Vogel KA, Williams CE, Lawrence RA. *Mechanisms of use of extracellular glutathione by lung epithelial cells and pulmonary artery endothelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12:662-8.
- 122 Davidson PC, Sternberg Jr P, Jones DP, Reed RL. *Synthesis and transport of glutathione by cultured human retinal pigment epithelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:2843-9.
- 123 Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Marí M, Ardite E, Morales A. *GSH-transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect.* Am J Physiol 1997; 273:G7-17.
- 124 Schnellmann RG. *Renal mitochondrial glutathione transport.* Life Sci 1991; 49:393-8.

- 125 Gilbert HF. *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol 1990; 63:69-172.
- 126 Berggren M, Dawson J, Moldéus P. *Glutathione biosynthesis in the isolated perfused rat lung: utilization of extracellular glutathione*. FEBS Letters 1984; 176:189-92.
- 127 Mårtensson J, Jain A, Frayer W, Meister A. *Glutathione metabolism in the lung: Inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:5296-300.
- 128 Ballatori N, Dutczak WJ. *Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes*. J Biol Chem 1994; 269:19731-7.
- 129 McIntyre TM, Curthoys NP. *Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal γ -glutamyltranspeptidase*. J Biol Chem 1979; 254:6499-504.
- 130 EL yaagoubi M, Visvikis A, Siest G, Wellman M. *Develomental- and tissue-specific DNA methylation patterns and expression of rat gamma-glutamyltransferase*. Biochem Mol Biol Intern 1995; 36:257-64.
- 131 Zlotkin SH, Anderson GH. *The development of cystathionase activity during the first year of life*. Pediatr Res 1982; 16:65-8.

- 132 Viña J, Vento M, García-Sala F, Puertes IR, Gascó E, Sastre J, Asensi M, Pallardó FV. *L-Cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency*. Am J Clin Nutr 1995; 61:1067-9.
- 133 Ellman GL. *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys 1959; 82:70-7.
- 134 Griffith OW. *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. Anal Biochem 1980; 106:207-12.
- 135 Davis JS, Balinsky JB, Harington JS, Shepherd JB. *Assay, purification, properties and mechanism of action of γ -glutamylcysteine synthetase from the liver of the rat and *Xenopus laevis**. Biochem J 1973; 133:667-78.
- 136 Sriram R, Ali-Osman F. *Purification and biochemical characterization of γ -glutamylcysteine synthetase from a human malignant astrocytoma cell line*. Biochem Mol Biol Int 1993; 30:1053-60.
- 137 Gipp JJ, Chang C, Mulcahy RT. *Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver γ -glutamylcysteine synthetase*. Biochem Biophys Res Commun 1992; 185:29-35.
- 138 Yan N, Meister A. *Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem 1990; 265:1588-93.

- 139 Seelig GF, Simondsen RP, Meister A. *Reversible dissociation of γ -glutamylcysteine synthetase into two subunits.* J Biol Chem 1984; 259:9345-7.
- 140 Board PG, Smith JE, Moore K, Ou D. *Erythrocyte γ -glutamylcysteine synthetase from normal and low-glutathione sheep.* Biochim Biophys Acta 1980; 613:534-541.
- 141 Skura R, Meister A. *γ -Glutamylcysteine synthetase. Further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specificity.* J Biol Chem 1977; 252:2599-605.
- 142 Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. *Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells.* J Biol Chem 1994; 269:26512-7.
- 143 Chang LS, Chang CC. *Biochemical regulation of the activity of γ -glutamylcysteine synthetase from rat liver and kidney by glutathione.* Biochem Mol Biol Int 1994; 32:697-703.
- 144 Richman PG, Meister A. *Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione.* J Biol Chem 1975; 250:1422-6.
- 145 Griffith OW, Meister A. *Selective inhibition of γ -glutamyl-cycle enzymes by substrate analogs.* Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:3330-4.

- 146 Gander JE, Sethna SS, Rathbun WB. *Bovine lens γ -glutamylcysteine synthetase. Inhibition by glutathione and adenine nucleotides.* Eur J Biochem 1983; 133:635-40.
- 147 Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. *Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase.* J Biol Chem 1993; 268:19675-80.
- 148 Ochi T. *Hydrogen peroxide increases the activity of γ -glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells.* Arch Toxicol 1995; 70:96-103.
- 149 Gipp JJ, Basiley HH, Mulcahy RT. *Cloning and sequencing of cDNA for the light subunit of human liver γ -glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues.* Biochem Biophys Res Commun 1995; 206:584-9.
- 150 Ohno K, Hirata M. *Induction of γ -glutamylcysteine synthetase by prostaglandin A2 in L-1210 cells.* Biochem Biophys Res Commun 1990; 168:551-7.
- 151 Richman PG, Orlowski M, Meister A. *Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by L-methionine-S-sulfoximine.* J Biol Chem 1973; 248:6684-90.

- 152 Huang CS, Moore WR, Meister A. *On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation.* Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:2462-8.
- 153 Orłowski M, Wilk S. *In vivo inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by L-methionine-RS-sulfoximine; influence on intermediates of the γ -glutamyl cycle.* J Neurochem 1975; 25:601-6.
- 154 Griffith OW, Meister A. *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-Butyl homocysteine sulfoximine).* J Biol Chem 1979; 254:7558-7560.
- 155 Di Ilio C, Del Boccio G, Casalone E, Aceto A, Sacchetta P. *Activities of enzymes associated with the metabolism of glutathione in fetal rat liver and placenta.* Biol Neonate 1986; 49:96-101.
- 156 Seelig GF, Meister A. *γ -Glutamylcysteine synthetase. Interactions of an essential sulfhydryl group.* J Biol Chem 1984; 259:3534-8.
- 157 Lebo RV, Kredich NM. *Inactivation of human γ -glutamylcysteine synthetase by cystamine. Demonstration and quantification of enzyme ligand complexes.* J Biol Chem 1978; 253:2615-23.

- 158 Fouré G, Meister A. *γ -Glutamylcysteine synthetase from erythrocytes*. *Methods in Enzymology* 1985; 113:390-2.
- 159 Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ. *γ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC*. *Am J Physiol* 1994; 267:L414-21.
- 160 Beutler E, Gelbart T. *Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase*. *Clinica Chimica Acta* 1986; 158:115-23.
- 161 Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld AM, Meister A. *Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: A model for endogenously produced oxidative stress*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9360-4.
- 162 Lestas AN, Rodeck CH. *Normal glutathione content and some related enzyme activities in the fetal erythrocytes*. *Br J Haematology* 1984; 57:695-702.
- 163 Harman AW, McKenna M, Adamson GM. *Postnatal development of enzyme activities associated with protection against oxidative stress in the mouse*. *Biol Neonate* 1990; 57:187-93.
- 164 Blume KG, Paniker NV, Beutler E. *Enzymes of glutathione synthesis in patients with myeloproliferative disorders*. *Clinica Chimica Acta* 1973; 45:281-5.

- 165 Wu AL, Moye-Rowley WS. *GSH1, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation.* Mol Cell Biol 1994; 14:5832-9.
- 166 Meister A. *Glutathione synthetase from rat kidney.* Methods in Enzymology 1985; 113:393-9.
- 167 Nakagawa CW, Mutoh N, Hayashi Y. *Glutathione synthetase from the fission yeast. Purification and its unique heteromeric subunit structure.* Biochem Cell Biol 1993; 71:447-53.
- 168 Debieu D, Deschavanne PJ, Malaise EP. *Low molecular weight thiol content in glutathione synthetase-deficient human fibroblasts.* Clin Chim Acta 1987; 170:161-8.
- 169 Jain A, Buist NRM, Kennaway NG, Powell BR, Auld AM, Martensson J. *Effect of ascorbate or N-acetylcysteine treatment in a patient with hereditary glutathione synthase deficiency.* J Pediatr 1994; 124:229-33.
- 170 Silber R, Farber CM, Papadopoulos E, Nevrla D, Liebes L, Bruck M, Brown R, Canellakis ZN. *Glutathione depletion in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes.* Blood 1992; 80:2038-43.
- 171 Igarashi T, Satoh T, Ueno K, Kitagawa H. *Sex-related difference in the hepatic glutathione level and related enzyme activities in rat.* J Biochem 1983; 93:33-6.

- 172 Hagenfeldt L, Larsson A, Andersson R. *The γ -glutamyl cycle and amino acid transport. Studies of free amino acids, γ glutamyl-cysteine and glutathione in erythrocytes from patients with 5-oxoprolinuria (glutathione synthetase deficiency).* N Eng J Med 1978; 299:587-90.
- 173 Spielberg SP, Boxer LA, Oliver JM, Allen JM, Schulman JD. *Oxidative damage to neutrophils in glutathione synthetase deficiency.* Br J Haematology 1979; 42:215-23.
- 174 Spielberg S, Butler JD, MacDermot K, Schulman JD. *Treatment of glutathione synthetase deficient fibroblasts by inhibiting γ -glutamyl transpeptidase activity with serine and borate.* Biochem Biophys Res Commun 1979; 89:504-11.
- 175 Divry P, Roulaud-Parrot F, Dorche C, Zabot MT, Contraire B, Hagenfeldt L, Larsson A. *5-Oxoprolinuria (glutathione synthetase deficiency): a case with neonatal presentation and rapid fatal outcome.* J Inher Metab Dis 1991; 14:341-4.
- 176 Oliver JM, Spielberg SP, Pearson CB, Schulman JD. *Microtubule assembly and function in normal and glutathione synthetase-deficient polymorphonuclear leukocytes.* J Immunology 1978; 120:1181-6.

- 177 Henderson MJ, Larsson A, Carlsson B, Dear PRF. *5-Oxoprolinuria associated with 5-oxoprolinase deficiency; further evidence that this is a benign disorder.* J Inher Metab Dis 1993; 16:1051-2.
- 178 Richie JPJr, Lang CA. *The determination of glutathione, cyst(e)ine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection.* Anal Biochem 1987; 163:9-15.
- 179 Forman HJ, Shi MM., Iwamoto T, Liu RM, Robison TW. *Measurement of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamylcysteine synthetase activities in cells.* Methods In Enzymology. 1995; 252:66-71.
- 180 Kim S, Wilson JJ, Allen KGD, Clarke SD. *Suppression of renal γ -glutamylcysteine synthetase expression in dietary copper deficiency* Biochim Biophys Acta 1996; 1313:89-94.
- 181 Seelig GF, Meister A. *Cystamine-Sepharose. A probe for the active site of γ -glutamylcysteine synthetase.* J Biol Chem 1982; 257:5092-6.
- 182 Chen Y, Saari JT, Kang YJ. *Expression of γ -glutamylcysteine synthetase in the liver of copper-deficient rats.* Proc Soc Exp Biol Med 1995; 210:102-6.

- 183 Dans: Pataki G. ed. *Techniques of thin-layer chromatography in amino acid and peptide chemistry*. Walter de Gruyter & Co, Berlin. Revised edition Ann Arbor Science Publishers Inc, Ann Arbor, Michigan USA. 1966; 218p.
- 184 Fernández-Checa J, Kaplowitz N. *The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis*. *Anal Biochem* 1990; 190:212-9.
- 185 Mulcahy RT, Bailey HH, Gipp JJ. *Up-regulation of γ -glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 34:67-71.
- 186 Borroz KI, Buetler TM, Eaton DL. *Modulation of γ -glutamylcysteine synthetase large subunit mRNA expression by butylates hydroxyanisole*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 126:150-5.
- 187 Li S, Thompson SA, Woods JS. *Localization of γ -glutamylcysteine synthetase mRNA expression in mouse brain following methylmercury treatment using reverse transcription in situ PCR amplification*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 140:180-7.

- 188 Kannan R, Tang D, Mackic JB, Zlokovic BV, Fernandez-Checa JC. *A simple technique to determine glutathione (GSH) levels and synthesis in ocular tissues as GSH-bimane adduct: Application to normal and galactosemic guinea-pigs.* Exp Eye Res 1993; 56:45-50.
- 189 Lu SC, Ge JL., Kuhlenkamp J, Kaplowitz N. *Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo.* J Clin Invest 1992; 90:524-32.
- 190 Lu SC, Ge JL. *Loss of expression of GSH synthesis at low cell density in primary cultures of rat hepatocytes.* Am J Physiol 1992; 263:C1181-9.
- 191 Nash B, Tate SS. *Biosynthesis of rat renal γ -glutamyl transpeptidase. Evidence for a common precursor of the two subunits.* J Biol Chem 1982; 257:585-8.
- 192 Hughey RP, Curthoys NP. *Comparison of the size and physical properties of γ -glutamyltranspeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or with Triton X-100.* J Biol Chem 1976; 251:7863-70
- 193 Inoue M, Horiuchi S, Morino Y. *Affinity labeling of rat γ -glutamyl transpeptidase.* Eur J Biochem 1977; 73:335-42.

- 194 Tate SS, Meister A. *Affinity labeling of γ -glutamyl transpeptidase and location of the γ -glutamyl binding site on the light subunit.* Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:931-5.
- 195 Barouki R, Finidori J, Chobert MN, Aggerbeck M, Laperche Y, Hanoune J. *Biosynthesis and processing of γ -glutamyl transpeptidase in hepatoma tissue culture cells.* J Biol Chem 1984; 259:7970-4.
- 196 Tsao B, Curthoys NP. *Evidence that the hydrophobic domain of rat renal γ -glutamyltransferase spans the brush border membrane.* Biochim Biophys Acta 1982; 690:199-206.
- 197 Ingbar DH, Hepler K, Dowin R, Jacobsen E, Dunitz JM, Nici L, Jamieson JD. *γ -Glutamyl transpeptidase is a polarized alveolar epithelial membrane protein.* Am J Physiol 1995; 269:L261-71.
- 198 Nash B, Tate SS. *In vitro translation and processing of rat kidney γ -glutamyl transpeptidase.* J Biol Chem 1984; 259:678-85.
- 199 Hubbar SC, Ivatt RJ. *Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides.* Ann Rev Biochem 1981; 50:555-83.

- 200 Dunphy WG, Rothman JE. *Compartmentation of asparagine-linked oligosaccharide processing in the Golgi apparatus.* J Cell Biol 1983; 97:270-5.
- 201 Capraro MA, Hughey RP. *Processing of propeptide form of rat renal γ -glutamyltranspeptidase.* FEBS Lett 1983; 157:139-43.
- 202 Frielle T, Brunner J, Curthoys NP. *Isolation of the hydrophobic membrane binding domain of rat renal γ -glutamyltranspeptidase selectively labeled with 3-trifluoromethyl-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine.* J Biol Chem 1982; 257:14979-82.
- 203 Yamashita K, Hitoi A, Matsuda Y, Tsuji A, Katunuma N, Kobata A. *Structural studies of the carbohydrate moieties of rat kidney γ -glutamyltranspeptidase. An extremely heterogeneous pattern enriched with nonreducing terminal N-acetylglucosamine residues.* J Biol Chem 1983; 258:1098-107.
- 204 Dvorakova L, Krusek J, Stastny F, Lisy V. *Relationship between kinetic properties of γ -glutamyl transpeptidase and the structure of its saccharide moiety.* Biochim Biophys Acta 1996; 1292:163-7.
- 205 Stromme JH, Theodorsen L. *γ -Glutamyltransferase: Substrate inhibition, kinetic mechanism, and assay conditions.* Clin Chem 1976; 22:417-21.

- 206 Reed DJ, Ellis WW. *Influence of γ -glutamyl transpeptidase inactivation on the status of extracellular glutathione and glutathione conjugates.* Adv Exp Med Biol 1981; 137:75-86.
- 207 Graber R, Losa GA. *Apoptosis in human lymphoblastoid cells induced by acivicin, a specific γ -glutamyltransferase inhibitor.* Int J Cancer 1995; 62:443-8.
- 208 Viña JR, Blay P, Ramirez A, Castells A, Viña J. *Inhibition of γ -glutamyl transpeptidase decreases amino acid uptake in human keratinocytes in culture.* FEBS Letter 1990; 269:86-8.
- 209 Sweiry JH, Sastre J, Viña J, Elsässer HP, Mann GE. *A role for γ -glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system x_C^- in cystine transport by a human pancreatic duct cell line.* J Physiol 1995; 485:167-77.
- 210 Zaslavsky BY, Ossipov NN, Krivich VS, Baholdina LP, Rogozhin SV. *Action of surface-active substances on biological membranes. II Hemolytic activity of nonionic surfactants.* Biochim Biophys Acta 1978; 507:1-7.
- 211 Tsuchida S, Hoshino K, Sato T, Ito N, Sato K. *Purification of γ -glutamyltransferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney.* Cancer Res 1979; 39:4200-5.

- 212 Losa G, Morell A, Barandun S. *Correlations between enzymatic and immunologic properties of human peripheral blood mononuclear cells. I. Ectoenzymes of normal and immunodeficient peripheral blood mononuclear cells.* Am J Pathol 1982; 107:191-201, 1982.
- 213 Tongiani R, Paolicchi A, Chieli E. *Gamma-glutamyltranspeptidase induction by cortisol in liver parenchyma of unweaned rats.* Bioscience Reports 1984; 4:203-11.
- 214 Edwards AM. *Regulation of γ -glutamyltranspeptidase in rat hepatocyte monolayer cultures.* Cancer Res 1982; 42:1107-15.
- 215 Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. *γ -Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol 1994; 11:586:92.
- 216 Joyce-Brady M, Oakes SM, Wuthrich D, Laperche Y. *Three alternative promoters of the rat γ -glutamyltransferase gene are active in developing lung and are differentially regulated by oxygen after birth.* J Clin Invest 1996; 97:1774-9.
- 217 Shi ZZ, Habib GM, Lebovitz RM, Lieberman MW. *Cloning of cDNA and genomic structure of the mouse γ -glutamyl transpeptidase-encoding gene.* Gene 1995; 167:233-7.

- 218 Schudy A, Bangsow T, Flach R, Trost C, Schepelmann S, Weber P, Knüpfer E, Gassen HG. *Organization of the 5'-end of the porcine γ -glutamyl transpeptidase gene and identification of three different mRNAs in the kidney.* Biochem Biophys Res Commun 1996; 229:693-700.
- 219 Leh H, Courtay C, Gerardin P, Wellman M, Siest G, Visvikis A. *Cloning and expression of a novel type (III) of human γ -glutamyltransferase truncated mRNA.* FEBS Letters 1996; 394:258-62.
- 220 Smith GD, Ding JL, Peters TJ. *A sensitive fluorimetric assay for γ -glutamyl transferase.* Anal Biochem 1979; 100:136-9.
- 221 Rosalki SB, Tarlow D. *Optimized determination of γ -glutamyltransferase by reaction-rate analysis.* Clin Chem 1974; 20:11214.
- 222 Price CP, O'Meara J, Wenham PR. *Optimal γ -glutamyltransferase assay?* Clin Chem 1976; 22:122.
- 223 Staal GEJ, Visser J, Veeger C. *Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes.* Biochim Biophys Acta 1969; 185:39-48.
- 224 Worthington DJ, Rosemeyer MA. *Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties.* Eur J Biochem 1975; 60:459-66.

- 225 Untucht-Grau R, Schirmer RH, Schirmer I, Krauth-Siegel L. *Glutathione reductase from human erythrocytes. Amino-acid sequence of the structurally known FAD-binding domain.* Eur J Biochem 1981; 120:407-19.
- 226 Boggaram V, Larson K, Mannervik B. *Characterization of glutathione reductase from porcine erythrocytes.* Biochim Biophys Acta 1978; 527:337-47.
- 227 Carlberg I, Mannervik B. *Glutathione reductase.* Methods in Enzymology 1985; 113:484-90.
- 228 Carlberg I, Mannervik B. *Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver.* J Biol Chem 1975; 250:5475-80.
- 229 Lopez-Barea J, Lee CY. *Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation.* Eur J Biochem 1979; 98:487-99.
- 230 Collinson LP, Dawes IW. *Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase.* Gene 1995; 156:123-7.
- 231 Gilliland GL. *Glutathione proteins.* Current Opinion in Structural Biology 1993; 3:875-84.
- 232 Harvey JW, Kaneko JJ. *Mammalian erythrocyte glutathione reductase: Kinetic constants and saturation with cofactor.* Am J Vet Res 1975; 36:1511-3.

- 233 Schulz GE. *Gene duplication in glutathione reductase*. J Mol Biol 1980; 138:335-47.
- 234 Rescigno M, Perham RN. *Structure of the NADPH-binding motif of glutathione reductase: Efficiency determination by evolution*. Biochemistry 1994; 33:5721-7
- 235 Carlberg I, Mannervik B. *Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol*. FEBS Lett 1979; 98:263-6.
- 236 Nakashima K, Miwa S, Yamauchi K. *Human erythrocyte glutathione reductase. I. Purification and properties*. Biochim Biophys Acta 1976; 445:309-23.
- 237 Staal GEJ, Veeger C. *The reaction mechanism of glutathione reductase from human erythrocytes*. Biochim Biophys Acta 1969; 185:49-62.
- 238 Worthington DJ, Rosemeyer MA. *Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation*. Eur J Biochem 1976; 67:231-8.
- 239 Kaplan JC, Beutler E. *Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leucocytes*. Nature 1968; 217:256-8.
- 240 Spooner RJ, Delides A, Goldberg M. *Heat stability and kinetic properties of human serum glutathione reductase activity in various disease states*. Biochem Med 1981; 26:239-48.

- 241 Yawata Y, Tanaka KR. *Studies on glutathione reductase and regeneration of reduced glutathione in normal human adult and cord red cells.* Clinica Chimica Acta 1973; 46:267-75.
- 242 Staal GEJ, Helleman PW, de Wael J, Veeger C. *Purification and properties of an abnormal glutathione reductase from human erythrocytes.* Biochim Biophys Acta 1969; 185:63-9.
- 243 Moroff G, Kosow DP. *Characterization of human platelet glutathione reductase.* Biochim Biophys Acta 1978; 527:327-36.
- 244 Okuda J, Hirai Y, Hayazaki T. *Mechanism of inhibition of erythrocyte glutathione reductase by Mitomycin-C.* Clin Chim Acta 1989; 181:37-46.
- 245 Perham RN, Scrutton NS, Berry A. *New enzyme for old: Redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase.* BioEssays 1991; 13:515-25.
- 246 Shinohara K, Tanaka KR. *Mechanism of inhibition of red blood cell glutathione reductase activity by BCNU (1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea).* Clin Chim Acta 1979; 92:147-52.
- 247 Schallreuter KU, Gleason FK, Wood JM. *The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase.* Biochim Biophys Acta 1990; 1054:14-20.

- 248 Chang JC, Van der Hoeven LH, Haddox CH. *Glutathione reductase in the red blood cells*. Ann Clin Lab Sci 1978; 8:23-9.
- 249 Jung K, Kühler S, Klotzek S, Becker S, Henke W. *Effect of storage temperature on the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase in rat liver and kidney homogenates*. Enzyme Protein 1993; 47:149-55.
- 250 Blume KG, Rüdiger HW, Löhr GW. *Electrophoresis of glutathione reductase from human red blood cells*. Biochim Biophys Acta 1968; 151:686-8.
- 251 Ramachandran M, Iyer GYN. *Erythrocyte glutathione reductase in iron deficiency anaemia*. Clin Chim Acta 1974; 52:225-9.
- 252 Eng LIL, Wan WP, Ng T. *Reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and pyruvate kinase in erythrocytes of human newborns and adults in Malaysia*. Br J Haematol 1973, 25:577-84.
- 253 Berry DH, Brewster MA. *Riboflavin, FAD, glutathione, and active glutathione reductase in neonatal erythrocytes*. Biol Neonate 1976; 30:245-9.
- 254 Frischer H, Ahmad T. *Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency*. J Lab Clin Med 1987; 109:583-8.

- 255 Al-Turk WA, Stohs SJ, El-Rashidy FM, Othman S, Shaheen O. *Glutathione, glutathione S-transferase and glutathione reductase in human erythrocytes and lymphocytes as a function of sex.* Drug Design and Delivery 1987; 1:237-43.
- 256 Al-Turk WA, Stohs SJ, El-Rashidy FH, Othman S, Shaheen O. *Changes in glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age.* Pharmacology 1987; 34:1-8.
- 257 Shapiro BL, Smith QT, Martinez A. *White-cell glutathione reductase in cystic fibrosis.* Lancet 1974; 2:1020-1.
- 258 Farber CM, Kanganis DN, Liebes LF, Silber R. *Antioxidant enzymes in lymphocytes from normal subjects and patient with chronic lymphocytic leukaemia: increased glutathione peroxidase activity in CLL B lymphocytes.* Br J Haematology 1989; 72:32-5.
- 259 Stankova L, Rigas DA, Keown P, Bigley R. *Leukocyte ascorbate and glutathione: Potential capacity for inactivation oxidants and free radicals.* J Reticuloendothelial Soc 1977; 21:97-102.
- 260 Moron MS, Depierre JW, Mannervik B. *Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver.* Biochim Biophys Acta 1979; 582:67-78.

- 261 Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL, Das DK. *Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress.* Am J Physiol 1993; 264:C715-22.
- 262 Mezzetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, Aceto A, Marzio L, Frederici G, Cuccurullo F. *Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery, vein and heart.* J Mol Cell Cardiol 1990; 22:935-8.
- 263 Michiels C, Toussaint O, Remacle J. *Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells.* J Cell Physiol 1990; 144:295-302.
- 264 Pinto RE, Bartley W. *The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates.* Biochem J 1969; 112:109-15.
- 265 Yam J, Frank L, Roberts RJ. *Age-related development of pulmonary antioxidant enzymes in the rat.* Proc Soc Exp Biol Med 1978; 157:293-6.
- 266 Pinto RE, Bartley W. *Changes in glutathione reductase and glutathione peroxidase activities in rat liver related to age and sex.* Biochem J 1968; 109:34P.
- 267 Giblin FJ, McCready JP. *The effect of inhibition of glutathione reductase on the detoxification of H₂O₂ by rabbit lens.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24:113-8.

- 268 Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. *Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide.* J Clin Invest 1984; 73:706-13.
- 269 Krohne-Ehrich G, Schirmer RH, Untucht-grau R. *Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide.* Eur J Biochem 1971; 80:65-71.
- 270 Nichols EA, Ruddle FH. *Polymorphism and linkage of glutathione reductase in Mus musculus.* Biochemical Genetics 1975; 13 :323-9.
- 271 De la Chapelle A, Vuopio P, Icén A. *Trisomy 8 in the bone marrow associated with high red cell glutathione reductase activity.* Blood 1976; 47:815-26.
- 272 De la Chapelle A, Icén A, Aula P, Leisti J, Turleau C, de Grouchy J. *Mapping of the gene for glutathione reductase on chromosome 8.* Ann Génét 1976; 9:253-6.
- 273 De la Chapelle A, Vuopio P, Icén A. *Red cell glutathione reductase activity in patients with bone-marrow trisomy 8.* Cytogenetics & Cell Genetics 1976; 16:277-9.

- 274 Jensen PKA, Junien C, Despoisse S, Bernsen A, Thelle T, Friedrich U, de la Chapelle A. *Inverted tandem duplication of the short arm of chromosome 8: A non-random de novo structural aberration in man. Localization of the gene for glutathione reductase in subband 8p21.1.* Ann Génét 1982; 25:207-11.
- 275 Gutensohn W, Rodewald A, Haas B, Schlulz P, Cleve H. *Refined mapping of the gene for glutathione reductase on human chromosome 8.* Hum Genet 1978; 43:221-4.
- 276 Magenis RE, Reiss J, Bigley R, Chamberlin J, Lovrien E. *Exclusion of glutathione reductase from 8pter → 8p22 and localization to 8p21.* Cytogenet Cell Genet 1978; 22:446-8.
- 277 Sinet PM, Bresson JL, Couturier J, Laurent C, Prieur M, Rethoré MO, Taillemite JL, Toudic D, Jérôme H, Lejeune J. *Localisation probable du gène de la glutathion réductase (EC 1.6.4.2.) sur la bande 8p21.* Ann Génét 1977; 20:13-7.
- 278 Cholin S, Tonoki H, Hansen TN, Ledley FD. *Expression of recombinant human glutathione reductase in eukaryotic cells after DNA-mediated gene transfer.* Biochem Med Met Biol 1993; 49:108-13.
- 279 Tutic M, Lu X, Schirmer RH, Werner D. *Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA.* Eur J Biochem 1990; 188:523-8.

- 280 Ochi T. *Effects of an organic hydroperoxide on the activity of antioxidant enzymes in cultured mammalian cells.* Toxicology 1990; 61:229-39.
- 281 Vessey DA, Lee KH. *Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides.* J Invest Dermatol 1993; 100:829-33.
- 282 Izawa S, Inoue Y, Kimura A. *Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett 1995; 368:73-6.
- 283 Tabatabaie T, Floyd RA. *Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents.* Arch Biochem Biophys 1994; 314:112-119.
- 284 Garcia-Alfonso C, Sanz P, Repetto G, Repetto M, Lopez-Barea J. *Direct determination of glutathione reductase in cells cultured in microtitre plates as a biomarker for oxidative stress.* ATLA 1995; 23:531-8.
- 285 Warshaw JB, Wilson CW, Saito K, Prough RA. *The response of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung.* Pediatr Res 1985; 19:819-23.

- 286 Crouch LS, Prough RA, Kennedy KA, Snyder JB, Warshaw JB. *Rat lung antioxidant enzyme activities and their specific proteins during hyperoxia.* J Appl Physiol 1988; 65:797-804.
- 287 Hamburg DC, Tonoki H, Welty SE, Geske RS, Montgomery CA, Hansen TN. *Endotoxin induces glutathione reductase activity in lungs of mice.* Pediatr Res 1994; 35:311-5.
- 288 Becker K, Wilkinson AR. *Flavine adenine dinucleotide levels in erythrocytes of very low birthweight infants under vitamin supplementation.* Biol Neonate 1993; 63:80-5.
- 289 Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. *Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species.* J Appl Physiol 1978; 45:699-704.
- 290 Chen Y, Whitney PL, Frank L. *Comparative responses of premature versus full-term newborn rats to prolonged hyperoxia.* Pediatr Res 1994; 35:233-7.
- 291 Price LT, Chen Y, Frank L. *Epidermal growth factor increases antioxidant enzyme and surfactant system development during hyperoxia and protects fetal rat lungs in vitro from hyperoxic toxicity.* Pediatr Res 1993; 34:577-85.

- 292 Frank L, McLaughlin GE. *Protection against acute and chronic hyperoxic inhibition of neonatal rat lung development with the 21-aminosteroid drug U74389F.* *Pediatr Res* 1993; 33:632-8.
- 293 Kennedy KA. *Dietary antioxidants in the prevention of oxygen-induced injury.* *Seminars in Perinatology* 1989; 13:97-103.
- 294 Torbati D, Wafapoor H, Peyman GA. *Hyperbaric oxygen tolerance in newborn mammals - hypothesis on mechanism and outcome.* *Free Rad Biol Med* 1993; 4:695-703.
- 295 Okur H, Küçükaydin M, Köse K, Kontas O, Dogan P, Kazez A. *Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: The role of lipid peroxidation and management by vitamin E.* *J Pediatr Surg* 1995; 30:1416-9.
- 296 Clark DA, Fornabaio DM, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJS. *Contribution of oxygen-derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis.* *Am J Pathol* 1988; 130:537-42.
- 297 Miller MJS, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Clark DA. *SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis.* *Am J Physiol* 1988; 255:G556-65.
- 298 Russell GA. *Antioxidants and neonatal lung disease.* *Eur J Pediatr* 1994; 153:S36-41.

- 299 Smith CV, Hansen TN, Martin ME, McMicken HW, Elliott SJ. *Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia*. *Pediatr Res* 1993; 34:360-5.
- 300 Grigg J, Barber A, Silverman M. *Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in intubated premature infants*. *Arch Dis Child* 1993; 69:49-51.
- 301 Whyte HE, Fitzhardinge PM, Shennan AT, Lennox K, Smith L, Lacy J. *Extreme immaturity: Outcome of 568 pregnancies of 23-26 weeks' gestation*. *Obstet Gynecol* 1993; 82:1-7.
- 302 Allen MC, Donohue PK, Dusman AE. *The limit of viability - Neonatal outcome of infants born at 22 to 25 weeks' gestation*. *New Eng J Med* 1993; 329:1597-601.
- 303 Hoffman EL, Forrest C, Bennett C. *Birth weight less than 800 grams: Changing outcomes and influences of gender and gestation number*. *Pediatrics* 1990; 86:27-34.
- 304 Ardila J, Le Guennec JC, Papageorgiou A. *Influence of antenatal betamethasone and gender cohabitation on outcome of twin pregnancies 24 to 34 weeks of gestation*. *Seminars in Perinatology* 1994; 18:15-8.
- 305 Papageorgiou AN, Colle E, Farri-Kostopoulos E, Gelfand MM. *Incidence of respiratory distress syndrome following antenatal betamethasone: Role of sex, type of delivery, and prolonged rupture of membranes*. *Pediatrics* 1981; 67:614-7.

- 306 McElroy MC, Postle AD, Kelly FJ. *Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development.* Biochim Biophys Acta 1992; 1117:153-8.
- 307 Bernard S, Dubin JC, Madès Y, Le Cam M. *Sur les variations de quelques activités enzymatiques dans le globules rouge humain, au cours de diverses circonstances physiologiques et pathologiques.* Clinica Chimica Acta 1966; 14:300-10.
- 308 Autor AP, Frank A, Roberts RJ. *Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase: Relationship to idiopathic respiratory distress syndrome.* Pediatr Res 1976; 10:154-8.
- 309 Rosenfeld W, Concepcion L. *Endogenous antioxidant defenses in neonates.* Free Rad Biol Med 1986; 2:295-8.
- 310 Zima T, Stipek S, Crkovska J, Doudova D, Mechurova A, Calda P. *Activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase in fetal erythrocytes.* Prenatal Diagnosis 1996; 16:1083-5.
- 311 Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. *Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione.* J Appl Physiol 1987; 63:152-7.

- 312 Rollins D, Larsson A, Steen B, Krishnaswamy K, Hagenfeldt L, Moldéus P, Rane A. *Glutathione and γ -glutamyl cycle enzymes in human fetal liver*. J Phar Exp Ther 1981; 217:697-700.
- 313 Meister A. *Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy*. Pharmac Ther 1991; 51:155-94.
- 314 Yawata Y, Tanaka KR. *Regulatory mechanism of glutathione reductase activity in human red cells*. Blood 1974; 43:99-109.
- 315 Tsui E, Yeung D. *Development of γ -glutamylcysteine synthetase and oxoprolinase in rat kidney*. Experientia 1979; 35:1293-4.
- 316 Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. *Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and the effect of maternal hypoxia*. Brain Res 1988; 470:173-9.
- 317 Kehrer JP, Aitor AP. *Age-dependent lipid peroxidation in neonatal rat lung tissue*. Arch Biochem Biophys 1977; 181:73-81.
- 318 Vlessis AA, Mela-Riker L. *Perinatal development of heart, kidney, and liver mitochondrial antioxidant defense*. Pediatr Res 1989; 26:220-6.

- 319 Cameron R, Kellen J, Kolin A, Malkin A, Farber E. *γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis.* Cancer Res 1978; 38:823-9.
- 320 de Oliveira IMV, Fujimori E. *Liver gamma-glutamyltranspeptidase activity and glutathione levels in lactating rats and pups; Effect of dietary protein quantity and feed intake.* J Nutr Biochem 1996; 7:93-8.
- 321 Kalengayi MMR, Ronchi G, Desmet VJ. *Histochemistry of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B₁-induced carcinogenesis.* J Natl Cancer Inst 1975; 55:579-88.
- 322 Bakhle YS. *Synthesis and catabolism of cyclo-oxygenase products.* Brit Med Bull 1983; 39:214-8.
- 323 DeWitt DL, El-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL. *The aspirine and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthase.* J Biol Chem 1990; 265:5192-8.
- 324 Vapaatalo H. *Free radicals and anti-inflammatory drugs.* Med Biol 1986; 64:1-7.

- 325 Wu KKY. *Regulation of eicosanoid biosynthesis in endothelial cells: critical role of de novo synthesis of prostaglandin endoperoxide synthase.* Dans: Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis, Ed. Liu CY and Chien S, Plenum Press, NY, 1990; 297-301.
- 326 Kulmacz RJ, Ren Y, Ah-Lim T, Palmer G. *Prostaglandin H synthase: spectroscopic studies of the interaction with hydroperoxides and with indomethacin.* Biochemistry 1990; 29:8760-71.
- 327 Shimokawa T, Kulmacz RJ, DeWitt DL, Smith WL. *Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis.* J Biol Chem 1990; 265:20073-6.
- 328 Warso MA, Lands WEM. *Lipids peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology.* Brit Med Bull 1983; 39:277-80.
- 329 Egan RW, Gale PH, Kuehl Jr FA. *Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase.* J Biol Chem 1979; 254:3295-302.
- 330 Ham EA, Egan RW, Soderman DD, Gale PH, Kuehl FA. *Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase.* J Biol Chem 1979; 254:2191-4.

- 331 Copper Jr JAD, Merrill WW. *Modulation of pulmonary prostanoid concentration by glutathione*. FASEB J 1989; 3:A1226.
- 332 Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hamill AL, Cohn ZA. *Arachidonic acid metabolism in glutathione-deficient macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:1621-5.
- 333 Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. *Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor*. Am J Physiol 1986; 250:H1145-9.
- 334 Williamson JM, Meister A. *Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-prolinase substrate*. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:936-9.
- 335 Quadt JFA, Voss R, ten Hoor F. *Prostacyclin production of the isolated pulsatingly perfused rat aorta*. J Pharmacol Method 1982; 7:263-70.
- 336 Grabowski EF, Faffe EA, Weksler BB. *Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress*. J Lab Clin Med 1985; 105:36-43.
- 337 Nollert MU, Hall ER, Eskin SG, McIntire LV. *The effect of shear stress on the uptake and metabolism of arachidonic acid by human endothelial cells*. Biochim Biophys Acta 1989; 1005:72-8.

- 338 Clive DR, Greene JJ. *Cooperation of protein disulfide isomerase and redox environment in the regulation of NF- κ B and AP-1 binding to DNA.* Cell Biochem Funct 1996; 14:49-55.
- 339 Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. *Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF κ B.* Nature 1993; 365:182-5.
- 340 Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF κ B transcription factor and HIV-1.* EMBO J 1991; 10:2247-58.
- 341 Schreck R, Albermann KAJ, Baeuerle PA. *Nuclear factor κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells.* Free Rad Res Comms 1992; 17:221-37.
- 342 Nose K, Shibamura M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T. *Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line.* Eur J Biochem 1991; 201:99-106.
- 343 Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. *H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of the NF κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor.* EMBO J 1993; 12:2005-15.

- 344 Zawaski K, Gruebele A, Kaplan D, Reddy S, Mortensen A, Novak RF. *Evidence for enhanced expression of c-fos, c-jun, and the Ca^{2+} -activated neutral protease in rat liver following carbon tetrachloride administration.* Biochem Biophys Res Commun 1993; 197:542-8.
- 345 Demple B. *Regulation of bacterial oxidative stress genes.* Annu Rev Genet 1991; 25:315-37.
- 346 Toledano MB, Leonard WJ. *Modulation of transcription factor $NF_{\kappa}B$ binding activity by oxidation-reduction in vitro.* Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4328-32.
- 347 Bry K, Lappalainen U, Waffarn F, Teramo K, Hallman M. *Influence of fetal gender on the concentration of interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and in newborn urine.* Pediatr Res 1994; 35:130-4.
- 348 Torday JS, Nielsen HC, de Fencel M, Avery ME. *Sex differences in fetal lung maturation.* Am Rev Respir Dis 1981; 123:205-8.
- 349 Frank L, Price LT, Whitney PL. *Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung.* Biol Neonate 1996; 70:116-27.
- 350 Suttorp N, Kästle S, Neuhof H. *Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia.* Lung 1991; 169:203-14.

- 351 White CW, Mimmack RF, Repine JE. *Accumulation of lung tissue oxidized glutathione (GSSG) as a marker of oxidant induced lung injury.* Chest 1986; 89:111S-3S.
- 352 Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W., Smith CAD. *Transcriptional regulation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells.* Biochem Biophys Res Commun 1996; 229:832-7.
- 353 Liu RM, Hu H, Robison TW, Forman HJ. *Differential enhancement of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells.* Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:186-91.
- 354 Brothwood M, Wolke D, Benson J, Cooper D. *Prognosis of the very low birthweight baby in relation to gender.* Arch Dis Child 1986; 61:559-64.
- 355 Verloove-Vanhorick SP, Veen S, Ens-Dokkum MH, Schreuder AM, Brand R, Ruys JH. *Sex difference in disability and handicap at five years of age in children born at very short gestation.* Pediatrics 1994; 93:576-79.
- 356 Brown LAS, Perez JA, Harris FL, Clark RH. *Glutathione supplements protect preterm rabbits from oxidative lung injury.* Am J Physiol 1996; 270:L446-51.

- 357 Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. *Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase*. J Biol Chem 1975; 250:5144-9.
- 358 Flohé L. *Glutathione peroxidase: fact and fiction*. C Foundation Symposium 1978; 65:95-122.
- 359 Martinez JIR, Launay JM, Dreux C. *Blood platelet glutathione peroxidase: Some properties and partial purification*. Thrombosis Res 1980; 19:73-83.
- 360 Darlow BA, Inder TE, Graham PJ, Sluis KB, Malpas TJ, Taylor BJ, Winterbourn CC. *The relationship of selenium status to respiratory outcome in the very low birth weight infant*. Pediatrics 1995; 96:314-9.
- 361 Yao WB, Abe T, Kurozumi Y, Yukihiro K, Tomozawa M, Ubuka T. *Effect of glucose-cysteine adduct as a cysteine prodrug in rats*. Amino Acids 1997; 12:85-94.